

Série A, N° 4497

N° d'ordre : 5344

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

BÉNEX JACQUELINE

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES SUR L'INFECTION EXPERIMENTALE
DE TENTACULES DE PLANORBES EN SURVIE,
PAR DES MIRACIDIUMS DE SCHISTOSOMA MANSONI

APPLICATION A L'ANALYSE DE LA SPECIFICITE PARASITAIRE.

2^e THÈSE. — "L'Immunité dans les affections à Plasmodiums"

11 JUIN 1965
Soutenues le

devant la commission d'examen.

MM. Thomas A. *Président.*

Hollande A. *Examinateur*

Houillon Ch. *Examinateur*

Série A, N° 4497

N° d'ordre : 5344

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

BÉNEX JACQUELINE

1^{re} THESE. — RECHERCHES SUR L'INFECTION EXPERIMENTALE
DE TENTACULES DE PLANORBES EN SURVIE,
PAR DES MIRACIDIUMS DE SCHISTOSOMA MANSONI

APPLICATION A L'ANALYSE DE LA SPECIFICITE PARASITAIRE.

2^e THESE. — "L'Immunité dans les affections à Plasmodiums"

Soutenues le

devant la commission d'examen.

MM. Thomas A. *Président.*

Hollande A. *Examinateur*

Houillon Ch. *Examinateur*



FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

Doyen... M. ZAMANSKY

PROFESSEURS

BRELOT.....	T	Analyse supérieure	DIKMIER.....	T	Mathématiques MPC
PRENANT.....	T	Anatomie et histologie comparée	SOUCHAY.....	T	Chimie générale
GRASSE.....	T	Evolution des êtres organisés	AIGRAIN.....	T	Electro.techn.géné.
PREVOST.....	T	Chimie organique	BRUSSET.....	T	Chimie systématique
WYART.....	T	Minéralographie	M. LEVY.....	T	Physique théorique des hautes énergies (Orsay)
TEISSIER.....	T	Zoologie	Mme CHADK.....	T	Chimie biologique
MANGENOT.....	T	Biologie végé (Orsay)	Mme HUREL PY	T	Biologie végétale PCB
AUGER.....	T	Physique quantique et relativité	PANNETIER...	T	Chimie générale
MONNIER.....	T	Physiologie générale	BRUN.....	T	Mécanique des fluides I
PIVETEAU.....	T	Paléontologie	LEDERER.....	T	Chimie biologique (Orsay)
ROCARD.....	T	Physique ENS	Mme DUBREIL..	T	Mathématiques (agrégé)
CARTAN.....	T	Mathématiques ENS	Mme LELONG...	T	Math II ENS
LAFFITE.....	T	Chimie générale	BELLAIR.....	T	Géologie SPCN
N.....	T	Géométrie supérieure	COTTE.....	T	Physique électricité
COULOMB.....	T	Physique du globe	DUBOIS J. E...	T	Chimie organique
Mie COUSIN...	T	Biologie animale SPCN	LAMOTTE.....	T	Zoologie ENS
CHRETIEN...	T	Chimie minérale	MICHEL A.....	T	Chimie minérale Orsay
BOCQUET.....	T	Zoologie	OLMER.....	T	Ennérgétique générale
KASTLER.....	T	Physique ENS	ROUAULT.....	T	Electricité (Orsay)
EPHRUSSI...	T	Génétique	GAUTHIER.....	T	Mécanique appliquée
RIVIERE.....	T	Géologie SPCN & sédiment (Orsay)	BARCHEWITZ..	T	Chimie physique
GAUTHIERET..	T	Biologie végétale PCB	BROSSEL.....	T	Physique atomique
LUCAS R.....	T	Recherches physiques	BUSER.....	T	Physiologie comparée
THOMAS A....	T	Biologie cellulaire	CAMUS.....	T	Physio. végé.
ARNULF.....	T	Optique appliquée	CASTAING.....	T	Physique II thermo (Orsay)
MORAND.....	T	Physique enseignement	CURIEN.....	T	Minéralo & cristal
SOLEILLET...	T	Physique PCB	MOYSE.....	T	Physio. végé. (Orsay).
FORTIER.....	T	Mécanique exp. des fluides	Mme CHARNIAUX		
DRACH.....	T	Zoologie	COTTON.....	T	Evolution des êtres organisés
QUENEY.....	T	Météo & dynamique atmos	POSSOMPE...	T	Zoologie
GALLIEN.....	T	Embryologie	PULLMANN...	T	Chimie quantique
EICHORN.....	T	Botanique	TEILLAC.....	T	Physique nuc. et radioactiv. (Orsay)
DE CUGNAC...	T	Biologie végétale SPCN	TONNELAT...	T	Bio physico chim (Orsay)
Mie CAUCHOIS.	T	Chimie physique	VILLE.....	T	Econométrie
THELLIER....	T	Physique du globe	WILLEMART...	T	Chimie PCB
L'HERITIER...	T	Biologie générale Orsay	DODE.....	T	Chimie (Orsay)
GRIVET.....	T	Radioélectricité Orsay	FREYMANN....	T	Recherches physiques
PONCIN.....	T	Mécanique générale	GUINOCHET...	T	Biolio végé SPCN (Orsay)
DE BREUL...	T	Arith & Théorie des nombres	ROLLET.....	T	Chimie minérale
QUELET.....	T	Chimie organique	Mie JOSIEN...	T	Chimie SPCN
CAGNIARD....	T	Géophysique appliquée	CHEVALLEY...	T	Géométrie algébrique et théorie des groupe
CHAMPETIER..	T	Chimie macromoléculaire	ARNOULT.....	T	Electronique Orsay
CUVILLIER...	T	Micropaléontologie	CHAPELLE....	T	Physique I (Orsay)
JUNG.....	T	Géologie	DELANGÉ.....	T	Mathématiques I (Orsay)
TRILLAT.....	T	Microscopie et diffrac-élec	DENY.....	T	Mathé. géné. (Orsay)
WIEMANN.....	T	Chimie organ. & structurale	GERMAIN.....	T	Mécanique théorique des fluides
JACQUINOT...	T	Spectroscopie et physique céleste (Orsay)	LUCAS.....	T	Géologie
VASSY.....	T	Physique de l'atmosphère	ALLARD.....	T	Chimie physique
DESTOUCHES.	T	Théorie physique	BERTHELOT...	T	Physique des particules fondamentales (Orsay)
AMIEL.....	T	Chimie générale	BRICARD.....	T	Météor et physique de l'atmosphère
HOCART.....	T	Minéral & cristal	Mme ALBE FESSARD		T Psycho physio
J. P. MATHIEU.	T	Physique optique	FRIEDEL.....	T	Physique des solides (Orsay)
COUTEAUX...	T	Cytologie	M. JULIA.....	T	Etudes des moléculaires complexes
MAY.....	T	Zoologie	LENDER.....	T	Biologie animal SPCN Orsay
CHOQUET.....	T	Théorie des fonctions et topologie	MAGAT.....	T	Physico chimie des radio éléments
FELDMANN...	T	Biologie végétale marine	Melle QUINTIN.	T	Electrochimie
GUINIER.....	T	Physique des solides (Orsay)	MONOD.....	T	Chimie du métabolisme
JOST.....	T	Physiologie comparée	BENOIT.....	T	Physio animale Orsay
FORTET.....	T	Calcul des probabilité et physique mathé-	DE POSEEL...	T	Analyse numérique
		matiques	CHARLOT.....	T	Chimie analytique
SCHWARTZ....	T	Calcul dif & Intégral	LEMESE.....	T	Ecologie végétale Orsay
CHOUARD.....	T	Physiologie végétale	GUERIN.....	T	Chimie MPC Orsay
MALAVARD...	T	Aviation (technique aéron.)	CHATELET...	T	Chimie PCB
NORMANT.....	T	Synthèse organique	JEAN.....	T	Physio nucléaire Orsay
BENARD.....	T	Chimie minérale	MATTIER.....	T	Physique SPCN
BUVAT.....	T	Botanique ENS	BERGERARD...	T	Zoologie Orsay
DUGUE.....	T	Statistique mathématiques	BERTIN.....	T	Electronique Orsay
SOULAIRAC...	T	Psychophysiologie	BOUSSIÉRES.	T	Radiochimie
ULRICH.....	T	Physiologie végé. Appli.	Mme COUTURE		T Thermo et méca physique
MARECHAL...	T	Optique théo. & appliquée	ELLEMBERGER		T Géologie des grandes régions du globe (Orsay)
KIRRMANN...	T	Théories chimiques	FRANC.....	T	Biologie animale PCB
CHADEFAUD...	T	Botanique	SCHNELL.....	T	Botanique tropicale
Mie Le BRETON		Physio de la nutrition	STLKOWSKI...	T	Physiologie végétale
LELONG.....	T	Appli de l'ana. à la géométrie	ACHER.....	T	Chimie biologiques
DEVILLERS...	T	Anatomie & histo comparées	BAUDOIN.....	T	Biologie animale PCB
EHRESMANN...	T	Topologie algébrique	BEAUMONT...	T	Biologie animale SPCN
FRANCON.....	T	Physique SPCN	BLAMONT.....	T	Géophysique ionosphère
GLANGEAUD...	T	Géogra. phys. & géol.	BOUREAU.....	T	Botanique
DODEMENT...	T	Mathématiques MGP	CURIE D.....		Physique MGP
PISOT.....	T	Technique math de la physique	DURAND DELGA		T Géologie
ROCH.....	T	Géologie	FREON.....	T	Chimie organique Orsay
SCHATZMANN.	T	Astrophysique	HELLER.....	T	Physiologie végétale
TERMIER.....	T	Géologie générale	TORTRAT.....	T	Calcul des probabilités
ZAMANSKY...	T	Mathématiques générale	CAILLEUX...	T	Géologie SPCN
LENNUIER...	T	Physique MGP	MAGNAN.....	T	Physique électricité
RIZET.....	T	Génétique Orsay	DAUDEL.....	T	Mécanique ondulatoire appli à la chimie théo & à la phy nucléaire.
ROUTHIER...	T	Géologie appliquée			Biologie végétale SPCN
Mme TONNELAT	T	Physique théorique	Mie FOURCROY.		

Mme CHOQUET BRUHAT	Mécanique analytique et méca céleste	GOURDIN	T	Physique théorique (Orsay) des hautes énergies
Mie VEIL	T Physiologie générale	LEHMANN	T	Phys exp des hautes énergies
LWOFF	T Microbiologie	NATAF	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay).
SIESTRUNCK	T Méca phys & expérimentale	ECHALIER		Biologie animale PCB
LACOMBE	T Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay)	BARRAUD		Physiol. cellulaire
BROCHARD	T Physique PCB (Orsay)	LIORÉ		Physiologie végé Orsay
CABANNES	T Mécanique générale	DARS		Géologie structurale & géol. appl.
LESIEUR	T Math I (Orsay)	CANEFORT	T	Botanique (agrégation)
MAZET	T Méca géné (Orsay)	VICHNIEWSKY	T	Mécanique industrielle
CAIRE	T Géogra physique et géo dynamique	BLAQUIERE		Electronique (Orsay)
COMOLET	T Méca des fluides	ARNOUS	T	Physique théorique
CORABOEUF	T Physio animale (Orsay)	TATTIBOUET		Chimie (CSU Orléans)
DELLOUE	T Physique de l'exosphère	MALL	T	Math propé (Orsay)
GORENFLOT	T Botanique II (Orsay)	GAUDEMAR		Chimie propé
HOULLON	T Biologie animale PCB	PEREZ Y JORBA		Physique Exp des Hautes énergies (Orsay)
JULLIEN J.	T CHIMIE SPCN (Orsay)	DAVID	T	Chimie (agrégation Orsay)
MALGRANGE	T Technique mathé de la phys. (Orsay)	BROUSSE	T	Mécanique théorique
OLIVIER	T Astrophologie	ROSCH	T	Astronomie
NOZERAN	T Botanique II (Orsay)	GUY	T	Physique expérimentale
BLANC-LAPIERRE	T Physique ENS (Orsay)	LAZARD		Math MPC
CHEVAUGEON	T Botanique (Orsay)	MOREL Pierre		Physique MPC
KAHANE	T Mathématiques (Orsay)	ARSAC		Programmation
SAMUEL	T Math ENS féminines	LEFEBVRE		Chimie MPC
KOURGANOFF	T Astronomie (Orsay)	CHAPEVILLE		Biochimie
THIRY	T Méca céleste	BENOIT		Physique CPEM
ABELES	T Physique SPCN	RIO		Chimie CPEM
AMAT	T Physique PCB	JAUZEIN		Géologie ENS
AUBOIN	T Géologie	PREVOST Geor		BV CPEM
Mme BENOIT		FAVARD P.		BA CPEM
GUEUTAL	T Physique nucléaire et radioactivité (Orsay)	VILKAS		Chimie CPEM
BOUGIS	T Biologie marine Villefranche/mer	Mie PICINI		Chimie CPEM
BRUHAT	T Math MPC	LEQUEUX		Astronomie
BRUNN	T Géologie historique Orsay	COHEN TANNODJI		Physique MPC
CHABRAL	T Physique MGP (Orsay)	TAVERNIER		Physique CPEM
DEHEUVELS	T Math propé	Mme ROIZEN		"
D'ESPAGNAT	T Physique théorique (Orsay)	DURAND M.		BA SPCN
FURON	T Géologie SPCN	PASCAUD		Physiologie
Mme GANS	T Génétique	Mme PETIT		BA CPEM
GENEVES	T Biologie végétale PCB	BROUSSE		Géologie Orsay
GUILBERT	T Physique CUS Orléans	CAGNIAC		Physique agrégation Orsay
HUPE	T Pétrographie	LEBERRE		Zoologie (Orsay)
HOLLANDE	T Bio. géné.	SCHEFFER		Microbiologie (Orsay)
LIONS	T Analyse numérique	de GENNES		Physique des solides (Orsay)
HAITTE	T Chimie PCB	RIOU		Physique nuclé exp Orsay
MEYER	T Physique propé	CLAUSER		Chimie biol. Orsay
NICOLAS	T Géologie appliquée	CHEVALIER		Physio animale Orsay
PANIGEL	T Biologie générale	JANCOVICI		Physique atomique Orsay
RAVIER	T Pétrographie	FALK-VAIRANT		Physique nucléaire Orsay
ROSEAU	T Méca théorique des fluides	FETIZON		Chimie propé Orsay
ROUBINE	T Electronique	CERF		Mathématiques Orsay
SILBER	T Chimie PCB			
UEBERSFELD	T Electronique			
YVON	T Théories physiques			
HERVE	T Mathématiques			
NERON	T Math MPC (Orsay)			
Mme PECKER WIMEL	T Astrophysique			
BALKANSKY	T Physique MPC			
LE CORRE	T Electricité			
DELCROIX	T Physique théorique (Orsay)			

Secrétaire général..... R. POULAIN

Nos remerciements vont à Monsieur le Docteur R. DESCHIENS qui nous a admise comme Assistante dans son service de Parasitologie de l'Institut Pasteur, où ce travail a été exécuté. Nous lui exprimons toute notre reconnaissance pour son accueil bienveillant et pour l'intérêt qu'il a porté à nos recherches.

Que Monsieur le Professeur Jean André THOMAS qui fut notre Maître et qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse trouve ici le témoignage de notre profonde gratitude pour son enseignement, ses conseils et ses encouragements qu'il a bien voulu nous prodiguer malgré les nombreuses tâches qui l'assailaient. Nous lui renouvelons l'assurance de notre attachement et de notre respectueux dévouement.

Notre reconnaissance va également à Monsieur le Docteur Louis LAMY, Chef du Service de Parasitologie, qui nous a donné avec bienveillance la possibilité de poursuivre et de mener à bien nos recherches. Nous l'en remercions tout particulièrement.

Nous assurons Monsieur le Professeur GERNEZ-RIEUX, Directeur de l'Institut Pasteur, ainsi que Messieurs MARNEFFE, AUBLANT, MERCIER et VAUCEL, de notre attachement et de notre entier dévouement à la grande Maison qu'ils dirigent. Nous les prions ainsi que, Monsieur le Professeur TREFOUEL, Membre de l'Institut, de bien vouloir accepter l'expression de notre respectueuse gratitude pour nous avoir accueillie dans la grande famille pastoriennne.

Messieurs les Professeurs A. HOLLANDE et Ch. HOUILLON qui ont bien voulu s'intéresser à notre travail et faire partie de notre jury, trouveront ici l'expression de notre reconnaissance.

Nous remercions également le service de Photomicrographie de l'Institut Pasteur dont l'aide si efficace a permis la réalisation de notre iconographie.

A la mémoire de mon Père - A ma Mère - A ma Soeur.

A mes collègues pastoriens - A tous mes amis.

SOMMAIRE

- . -

PREMIERE PARTIE

INTRODUCTION

CHAPITRE 1. HISTORIQUE

1) La survie naturelle	3
2) La survie par le froid	5
3) Les milieux de survie	6
4) Les méthodes de survie	8
A) Les cultures tissulaires et cellulaires chez les Mollusques	8
B) Les cultures organo-typiques	9
a) Cultures organo-typiques en milieu solide	10
b) Cultures organo-typiques en milieu liquide.....	11

CHAPITRE 2. MATERIEL et METHODES.

A) MATERIEL :

Cycle des Schistosomes	23
Le Mollusque,	23
Le tentacule	27
Le miracidium	27

B) METHODES :

1) Méthode de survie de l'explant.....	28
a) principes de la méthode	28
b) composition du milieu de survie	29
c) évolution de la survie.....	31
2) Technique pour l'obtention des miracidiums de schistosomes	32
3) Technique d'infestation des explants par les miracidiums.....	33
4) Techniques histologiques	33

DEUXIEME PARTIE

Etude des explants
en survie.

CHAPITRE 1. Essais expérimentaux sur la survie d'explants.

A) Essais expérimentaux de désinfection des Mollusques préalablement au prélèvement de l'explant	37
B) Etude du milieu de survie	41
1° - La solution saline	42
a) étude de la composition ionique	42
b) étude des différents ions-rapports des ions	44
c) étude du système tampon	49
d) étude de l'évolution du pH de la solution saline	50
2° - La solution nutritive	
a) le glucose	51
b) les acides aminés	52
c) les vitamines	54
d) les liquides biologiques	54
e) les extraits tissulaires	55
f) les facteurs de croissance	56
3° - Les antiseptiques	
Choix des antibiotiques	60
4° - Etude du Δ° cryoscopique de la solution de survie...	60
5° - Etude du pH du milieu final	62

CHAPITRE 2. - Etude de la survie de l'explant.

1° - Etude dynamique et morphologique du tentacule en survie	
a) La cicatrisation.....	63
b) L'évolution morphogénétique : la dédifférenciation	63
2° - Etude histologique des tentacules en survie	64
Etude de l'évolution de la dédifférenciation des tissus dans le tentacule au cours de la survie.....	66
3° - Rôle du système nerveux dans la dédifférenciation des tissus	67
- Etude histologique de l'évolution du système nerveux dans un tentacule en survie.....	67
- Evolution comparative des explants pourvus ou dépourvus d'éléments nerveux importants	68
- Relations entre les phénomènes de dégénérescence et la présence de l'oeil	69

oooo

CHAPITRE 3. - Essais d'infestation des explants en survie par des miracidiums de S. mansoni

1° - Etude du comportement des miracidiums dans le milieu de survie	71
2° - Essais d'infestation des explants	72
A) Comportement du miracidium vis-à-vis de l'explant provenant d'un Mollusque réceptif.....	72
a) étude dynamique de la pénétration du miracidium	73
b) étude histologique de l'évolution du miracidium à l'intérieur de l'explant provenant d'un Mollusque réceptif	73
- Les sporocystes mères (dans le Mollusque (dans l'explant	74
- les sporocystes filles (dans le Mollusque (dans l'explant	75

IV

B) Etude histologique de l'évolution du miracidium dans des explants ou les tissus d'un Mollusque d'une autre provenance géographique	76
- dans le Mollusque	
- dans l'explant	
C) Comportement des miracidiums vis-à-vis d'un explant ou d'un Planorbe réfractaire à l'infestation	78
D) Rôle de l'âge de l'explant dans l'attraction et la pénétration du miracidium	78
a) Cas d'un Mollusque réceptif	78
b) " " " semi-réceptif	79
c) " " " réfractaire	79

TROISIEME PARTIE

Recherches relatives aux facteurs responsables de la
spécificité du choix d'un Mollusque par les
miracidiums.

CHAPITRE I. - Constatations expérimentales.

- Résultats expérimentaux sur la spécificité du
choix du Mollusque par le miracidium 85
- Interprétation des résultats 85
- Essais expérimentaux de substances attractives :
 - substances propres aux Mollusques 86
 - " chimiques 86

CHAPITRE II. - Recherches relatives à des substances sécrétées
par l'épithélium

- 1° - Mise en évidence des substances sécrétées par l'épi-
thélium de surface des tentacules 91
- 2° - Devenir des substances sécrétées au cours de la
survie de l'explant 92

CHAPITRE III. - Recherches relatives au rôle des substances en
cause, dans la spécificité de l'attraction miraci-
dienne.

- I - Essais expérimentaux d'attraction miracidienne 97
- II - Action de la thiomucase 99
 - 1) Essais préliminaires 99
 - 2) Action de l'enzyme sur les explants en survie 99
 - 3) Action de l'enzyme sur les sécrétions des
Mollusques vivants 102
 - 4) Action de l'enzyme sur des broyats muscu-
laires 102
 - 5) Action de l'enzyme sur des produits de
sécrétions extraits de l'organisme 103
- III - Devenir de l'attraction miracidienne après action
de la thiomucase sur les sécrétions de l'épithélium 103

DISCUSSIONS GENERALES

A - La méthode de survie, le milieu, les conditions de survie	107
B - Les phénomènes relatifs à l'explant en survie. La dédifférenciation structurale	112
C - Le parasitisme. L'évolution du parasite dans l'explant	114
La spécificité du choix du Mollusque par les miracidiums - Schéma général	115
CONCLUSIONS GENERALES	125

oo0oo

PREMIERE PARTIE

INTRODUCTION

De nombreux expérimentateurs ont mis en survie différents objets biologiques à des fins les plus diverses, soit dans le but d'études physiologiques, embryologiques, endocrinologiques, ou métaboliques, soit pour l'application à des problèmes précis tels que la morphogénèse expérimentale, la régénération, la cicatrisation et la greffe.

Nous avons, pour notre part, envisagé d'introduire parmi les méthodes applicables à la Biologie parasitaire, la mise en survie d'organes ou de fragments d'organes appartenant, soit à l'hôte définitif, soit à l'hôte intermédiaire et leur infestation in vitro.

L'étude des diverses phases du développement d'un parasite se heurte souvent à des difficultés concernant son évolution à l'intérieur de l'hôte, qu'il soit intermédiaire ou définitif. Les méthodes habituelles consistaient en l'étude anatomique sur lames de diverses formes évolutives, sans qu'il soit possible de suivre in vivo les modifications et les relations entre l'hôte et son parasite. Le problème de sa mise en évidence dans l'individu porteur était souvent d'ailleurs compliqué, par suite du trop grand nombre de coupes qu'il eut été nécessaire d'exécuter.

C'est pourquoi en vue de l'étude de certaines spécificités parasitaires, et en particulier de la susceptibilité de *Planorbis Australorboris glabratus* vis-à-vis des miracidiums de *Schistosoma mansoni*, nous avons été amenés à rechercher dans ce travail, la survie d'explants de Mollusques dulcicoles, dans un milieu composé, nutritif et antiseptique, pendant un temps suffisamment long pour permettre l'étude des possibilités de pénétration et de développement d'un parasite à l'intérieur de l'explant.

Son évolution dans un explant en survie, si elle se révélait possible, devrait faciliter l'étude de problèmes ultérieurs tels que :

les raisons du choix de l'hôte par la larve infestante et le devenir du parasite à l'intérieur des tissus, ou la récolte des différents stades larvaires en vue d'études immunologiques comparées (préparations d'antigènes parasitaires à partir des différents stades évolutifs).

Le problème se réduisait donc à obtenir une infestation d'un fragment d'organe isolé, maintenu en survie in vitro, qui reproduise aussi exactement que possible les conditions normales de la vie des tissus de l'hôte.

ooo0ooo

CHAPITRE I.

HISTORIQUE

Les études sur la survie expérimentale sont complexes et multiples. Leur domaine interfère avec de nombreuses méthodes de cultures de tissus et certaines techniques de cultures organo-typiques.

Dans les phénomènes de survie, nous distinguerons, au moins pour un rappel historique, les phénomènes de survie naturelle, puis les phénomènes de survie expérimentale, montrant leur rapport avec les techniques organo-typiques.

Ceci a été exposé récemment (1963) par J. André THOMAS, dans ses exposés actuels de biologie cellulaire "Survie et conservation biologique" (240), nous ne ferons donc qu'en rappeler les grandes lignes.

I - LA SURVIE NATURELLE

Les premières manifestations de survie rapportées, ne furent tout d'abord que des faits d'observation de survie naturelle. Les divers auteurs se contentent de surveiller la survie et la mort des tissus afin d'en tirer des conclusions sur leur indépendance vitale.

Ces travaux menés avec des idées philosophiques implicites, s'adressent tout naturellement aux Vertébrés.

Dès 1741, REDI (195) extrait le cerveau d'une Tortue, qui continue à vivre plusieurs mois. Ces expériences seront reprises par LE GALLOIS (102) en 1812 sur des Vertébrés à sang froid.

Puis de nombreuses observations sont faites par des médecins : par DOWLER en 1846 et KIENER en 1849 (voir 119), sur la contractibilité, naturelle ou provoquée, post-mortem. La conservation des contractions rythmiques du coeur après la mort, déjà signalée par Aristote, retient l'attention de VULPIAN (1858) (252), PARRUM (1858)

(190) BROWN-SEQUART (1858) (29). Le diaphragme son voisin topographique avait été signalé par BICHAT en 1818 (15) pour la conservation de sa contractibilité ainsi que la survie du nerf phrénique.

D'autres tissus sont étudiés pour la facilité de leur observation tels les spermatozoïdes (PREVOST et DUMAS 1824) (193), (BISCHOFF 1841) (17), (GODART 1857) (111), ou les cils vibratiles de divers épithéliums chez l'Homme (GOSSELIN 1851) (116), chez les Poecilothermes, ou les Homeothermes (VIRCHOW 1853) (250), (BIZZOZERO 1864) (18).

L'étude de l'irritabilité musculaire est suivie, dès 1811, par NYSTEN (186) et reprise par BROWN-SEQUARD entre 1851 et 1855.

La persistance des mouvements péristaltiques des organes isolés, fait aussi l'objet d'observations anciennes. Ainsi ENGELMAN en 1869 (82) remarque la persistance des contractions de l'uretère de Mammifère, puis RANVIER en 1876 (194), celle de l'estomac de Grenouille. SCHULTZ en 1897 (202-203), BOTTAZI en 1899 (22), et WOODWORTH 1899 (268) font des constatations analogues sur la conservation de la contractibilité des muscles lisses des Vertébrés.

Ces expériences sont déjà, dès BROWN-SEQUARD 1856-1859, combinées avec le maintien en solution saline ou en milieu naturel homologue (PELIKAN 1858) (192), et la mise à faible température (VULPIAN) (252), (du BOIS REYMOND 1859) (75).

Chez les Invertébrés, les observations si elles peuvent se référer à Aristote pour la constation de la survie d'Insectes décapités, sont cependant moins anciennes et moins nombreuses.

Les travaux sur les Insectes sont les plus précoces et les plus abondants. Ils portent sur l'étude des individus décapités, leurs possibilités de métamorphoses, leur vitalité (CONTE et VANEY 1911) (51), (CAMBOUE 1926) (33). Leur résistance aux traumatismes a permis de nombreuses études endocrinologiques, soit par ligature de segments de larves, soit par ablation d'organes ou de fragments d'organes : survie de parties postérieures chez Lymantria (KOPEC 1922) (145), Bombyx mori (BOUHNOL 1938) (23), Drosophila (BODENSTEIN 1936) (19), Laspeyresia pomonella (COUTIN et GRISON 1949) (58), entre autres. De telles expériences aboutissent à des survies saisissantes : (1 année pour la larve de Rhodnius) ou à de fines opérations comme celles de WILLIAMS en 1947 (259) qui permettent la survie de segments pendant plusieurs mois.

En dehors des Insectes, les observations portent sur le devenir des larves de Némerte après métamorphoses (VEILLET 1941) (249) ou sur certaines survies de Vers, doués de haut pouvoir de ré-

génération (GONTCHAROFF 1858) (113-114). D'autres observations furent ensuite faites sur les phénomènes de réapparition de la vie active après suppression de ses manifestations pendant un temps plus ou moins long. Mais les mécanismes mis en jeu dans ces phénomènes de reviviscence sont déjà forts éloignés de ceux de la survie proprement dite.

II - LA SURVIE PAR LE FROID.

Conjointement aux observations de survie naturelle, se font jour des idées de prolongation de vie par divers artifices. Le plus facile à envisager fut la conservation par le froid, et ce fut aussi le procédé le plus anciennement mis en oeuvre (R. BOYLE 1683) (24), et VULPIAN (252) écrivait en 1858, "les conditions de basses températures dans lesquelles se sont trouvés les sujets de nos observations, ont prolongé la durée de contractibilité après la mort".

Nous retrouverons comme sujet d'expérience le même matériel que précédemment, (SPALLANZANI vers 1780 (219) sur les spermatozoïdes et les oeufs de Grenouille et de Crapaud), (J. JOLLY de 1903 à 1913 (134-135-136-137-) sur les leucocytes et les globules rouges de Triton et de Rana temporaria.

Puis à la suite de Paul BERT (1866) (13), de HEDON et FLEIG (1903) (124) de nombreux physiologistes vont se servir de matériel préalablement soumis au froid à des fins les plus diverses (COW 1911 (59), MEYER 1913 (173), GUNN et UNDERHILL 1914 (117), BROUHA et FREDERICQ 1924 (27), MORIN 1929-35) (175-176).

Il nous paraît utile de rappeler que, dans toutes ces expériences, et en général, dès que l'on aborde les divers aspects de la survie expérimentale, le problème du milieu d'environnement des organismes ainsi conservés se pose conjointement.

Ces milieux dont l'action est primordiale dans le maintien de la survie, agissent par imbibition tissulaire. Leur réalisation et leur composition ont fait l'objet de très nombreux travaux. Réciproquement l'étude de la vitalité de certains organes conservés au froid a permis la mise au point des constituants essentiels de ces milieux. [CARDOT 1953) (34), (FISCHER, 1943) (91), (BINET, JULLIEN et coll., 1955) (16-138-139] .

De telles expériences conduisent progressivement du passage de la survie à faible température par imbibition des tissus, à la survie entretenue par des méthodes de perfusion d'organes réfrigérés à des températures beaucoup plus basses, et conservés par adjonction de substances protectrices. Mais de telles méthodes, là encore débordent le cadre de notre étude.

III - LES MILIEUX DE SURVIE.

Dans une étape suivante, s'est avérée la nécessité, même pour une survie naturelle, et à plus forte raison pour une survie expérimentale, de maintenir les explants en milieu salin le plus possible isotonique au milieu intérieur. De telles constatations sont déjà faites par les auteurs cherchant à prolonger la survie d'organismes par action de basses températures ; lors de la reprise de la vie les résultats obtenus étaient meilleurs si l'organisme en expérience était plongé dans une solution saline isotonique.

Les premiers expérimentateurs se contentent d'eau salée, [(KOLLIKER 1857) (141-142-143), (NASSE 1869) (179), (HERMANN 1879) (126)] , puis avec COHNHEIM en 1899 (50), débute l'étude des "bains de survie"

Mais la grande voie est ouverte par RINGER en 1880 et par LOCKE en 1895, qui recommandent de substituer à la simple eau salée des solutions salines équilibrées.

Ils seront suivis par toute une série d'expérimentateurs cherchant à préciser l'influence des solutions salines sur la survie [HOWELL 1898) (129), (HEDON et FLEIG 1903-1907) (123-125-95-95), (BENEDICT 1908) (85)] . Cependant très tôt les auteurs s'aperçoivent que les solutions physiologiques, même les plus complexes, n'entretiennent la survie que pendant un temps court. Ils cherchent alors à augmenter les possibilités nutritives de celles-ci, par adjonction de liquides organiques ou d'éléments divers (sucres, acides aminés, vitamines etc. . .).

Ces recherches encore poursuivies à l'heure actuelle, (chaque organisme ayant ses besoins propres selon sa provenance et les buts recherchés) gardent toute leur actualité, aux propos de Paul BERT (loc. cit. 13) qui, en 1866, dans sa thèse intitulée "Recherches expérimentales pour servir à l'histoire de la vitalité propre des tissus animaux", écrivait - "On sait aujourd'hui que l'élément possède une vie personnelle indépendante de la vie générale du corps auquel il appartient, et n'empruntant à ce corps qui n'est pour lui qu'un milieu, que les conditions nutritives nécessaires à réparer ses déperditions incessantes. Ces organites détachés du corps ne perdent pas aussitôt leurs propriétés caractéristiques. Celles-ci disparaissent, il est vrai plus ou moins rapidement, mais il est évident que cette perte est en rapport avec les nouvelles conditions dans lesquelles se trouve l'élément séparé, en sorte que si l'on pouvait par la pensée rendre à cet élément les conditions que lui présentait le milieu vivant en dehors de ce milieu même, il continuerait à vivre dans son isolement comme il vivait au sein de l'association organique dont il faisait partie. Tous les éléments qui constituent le corps, peuvent continuer à vivre après avoir été séparés de ce corps, si on

les replace dans les conditions, où les matériaux nutritifs puissent leur être apportés avec une suffisante abondance¹¹.

Renouvellement du milieu.

En même temps que se posait le problème de la composition du milieu de survie, la notion de durée avait retenu l'attention des expérimentateurs. Toutes les premières tentatives de survies expérimentales en milieu nutritif étaient relativement de courte durée.

Afin de prolonger celle-ci dans le temps, le renouvellement du milieu devint indispensable et les techniques de survie durent en tenir compte.

Puis lorsque l'on eut trouvé le moyen de conserver le sang total rendu incoagulable, les chercheurs reprirent les problèmes qui avaient préoccupé très tôt les physiologistes (CL. BERNARD 1848, LUDWIG 1868, BROWN-SEQUARD 1851-1858 etc...) et réalisèrent les expériences de maintien en survie d'organes entiers, parfois de grande taille, par des perfusions physiologiques du système vasculaire. Ces travaux aboutirent finalement aux belles expériences de circulation artificielle, qui prirent une grande ampleur ces dernières années, et trouvèrent leur application en chirurgie moderne.

L'aseptie.

Le maintien de la survie pendant une longue durée a amené les chercheurs à aborder un dernier problème, celui de l'aseptie. Lors de survies brèves, les milieux peuvent être septiques ; mais lors de survies prolongées, et de renouvellement du milieu, une aseptie plus ou moins stricte est nécessaire et souvent indispensable.

La simple stérilisation des milieux de survie et celle, plus ou moins facile, des explants préalablement à la mise en culture, (par des passages dans des solutions désinfectantes) ne suffisaient pas à assurer la poursuite d'une survie dans de bonnes conditions.

La découverte et la synthèse des sulfamides facilita le travail des expérimentateurs. Et les travaux de WOLFF et JULIUS en 1939 (266), de J. André THOMAS en 1941-1943 (233-234-235-236-237) sur les oeufs d'Oursin, de BARNE en 1940 (7) sur la peau de Grenouille, contribuèrent à généraliser l'emploi de ces substances.

Plus tard, après la découverte de FLEMING, une grande variété de substances antibiotiques furent définies et utilisées comme bactéricides et bactériostatiques, et détrônèrent les sulfamides.

Nous ne pouvons entrer dans le détail des très nombreux essais effectués jusqu'à ce jour. Nous discuterons le rôle et l'action de ces substances relativement à notre propre problème, chaque objet biologique ayant ses exigences spéciales selon la substance considérée et la technique utilisée.

Suivant ce rapide exposé, nous voyons se dessiner les trois grands volets des méthodes concernant les problèmes de la survie.

- a) La culture tissulaire et cellulaire.
- b) La culture organo-typique
- c) La culture d'organes par circulation artificielle.

IV - LES METHODES DE SURVIE

A - Les cultures tissulaires et cellulaires.

Ces méthodes ont pour but d'obtenir la multiplication au dehors de l'organisme de cellules douées de pouvoir de synthèse propre.

Les travaux exécutés en vue de telles cultures de tissus diffèrent donc totalement dans leurs techniques et leurs buts, de ceux poursuivis par nous dans cette étude. Nous en retiendrons cependant ceux relatifs aux tissus des Mollusques, les expérimentateurs s'étant heurtés à des problèmes voisins des nôtres pour la réalisation de leurs solutions de survie.

Les premiers travaux ont souvent été effectués avec peu de succès [DOBROWOLSKAIA (70), RUMSANZEW (200), KRONTOWSKY (148), JANDA et BOHUSLAV (132)].

Il faut attendre les travaux de GATENBY (103 à 108) et coll. dans les années 1931 à 1934, pour voir obtenir quelques résultats positifs. En effet, ces auteurs tentèrent maintes cultures à partir de tissus de Mollusques *Helix aspersa*. De petits fragments de 1/2 mm² étaient mis en culture en goutte pendante dans des milieux allant du simple sang de Mollusques, à des milieux plus complexes : Ringer, Hedon et Fleig, Ringer-Locke, Lewis, avec ou sans addition d'extraits de tissus de Mollusques homologues.

Dans les conditions optima, la survie maxima obtenue était d'une semaine sans aseptie rigoureuse. Après essais de stérilisation des Mollusques par rayons U. V. et de la solution par autoclave ou filtration, les tissus furent mis en culture par la même technique en solution de Hedon-Fleig, la durée de vie de la culture fut plus longue mais la prolifération cellulaire moins dense.

Premysls BOHUSLAV en 1933 (20-21), tenta des essais de cultures de tissus en goutte pendante à partir du tractus digestif, du tractus génital, des glandes salivaires et du coeur d'Helix.

Il nota que le sang seul (à la place du liquide amniotique des Vertébrés) était insuffisant comme solution de survie car trop pauvre en éléments nutritifs.

KÖNICEK en 1933 (144), sur le même Mollusque essaie sans succès des survies d'explants cardiaques. Mais l'année suivante HAUGTON (122) les réalisa pendant une durée de 3 à 6 jours.

En 1936 BUSCHBAUM (32), puis en 1949 BEVELANDER et MARTIN (14) revinrent à l'expérimentation sur des Mollusques marins plus facile à réaliser grâce à la possibilité d'utiliser l'eau de mer comme milieu de survie. Ces auteurs maintinrent des petits fragments de manteaux de Pintata radiata dans un milieu à base de plasma ; mais le délai maximum de survie ne dépassait pas six jours.

En 1958 FRIEDL (101) cultiva des explants d'atrium ou de vaisseaux sanguins de Limnea stagnalis qui continuèrent à battre de manière intermittente durant 5 à 40 jours.

La même année VAGO et CHASTANG (247-248) mirent en survie des explants de tunique pédieuse du Mollusque Helix aspersa ; puis en 1963 FLANDRE et VAGO (93) adaptèrent à la culture des tissus de Gastéropodes, leur technique de culture de tissus d'Insectes en coagulum plasmatique.

Enfin, Elie CHERNIN (44), depuis 1963, et encore actuellement poursuit ses recherches sur la culture de tissus à partir d'explants de muscle cardiaque d'Australorbis glabratus, Mollusque qui fait l'objet de notre propre étude.

Mais si ces travaux nous intéressent en ce qui concerne leurs milieux de survie, leurs techniques s'éloignent complètement de la nôtre, car ces auteurs cherchent à obtenir des lignées cellulaires à partir d'explants de Mollusques sans se préoccuper du devenir de l'explant lui-même. Ils réalisent des cultures et non pas des survies.

B - La culture organo-typique.

Parmi les méthodes de la culture organo-typique, on doit distinguer deux techniques différentes :

a) La culture organo-typique en milieu solide.

C'est la technique développée surtout à partir de 1927 par STRANGEWAYS et FELL (226-86-87) et continuée depuis 1952 par WOLFF et HAFFEN (262-264-265), et toutes les expérimentations qui en dérivent.

C'est principalement une culture in vitro d'organes embryonnaires pris au début de leur développement aux stades d'ébauches qui n'ont pas encore révélé toute leurs potentialités.

Cette méthode s'apparente beaucoup aux techniques de cultures tissulaires. Elle a suscité de très nombreux travaux chez les Vertébrés et les Amniotes. Depuis quelques années certains auteurs tentent de l'adapter aux organes d'Invertébrés. Mais les réalisateurs reconnaissent que les difficultés techniques sont plus grandes du fait de la complexité des divers milieux intérieurs et des problèmes posés par l'aseptie des cultures.

Les premiers essais conduits chez les Invertébrés, par cette méthode, l'ont été sur les blastèmes de régénération de Planaires, encore indifférenciés, par C. SENDEL en 1960 (209), et repris en 1963 (210). La durée de survie de ces explants étaient de 10 à 15 jours, sans croissance notable mais avec différenciation possible.

En 1961 Ph. SENDEL (211-212-213) s'adressa lui, aux organes des Invertébrés marins. L'eau de mer utilisée pour préparer le support gélosé, lui fournit un milieu de survie idéal. L'auteur maintint ainsi en survie pendant sept jours la lamelle branchiale et les diverticules intestinaux de Barnea candida (Mollusque bivalve) l'ovaire et l'organe cardio-péricardique de Ciona intestinalis (Tunicier ascidiacé). Puis en 1962, avec M. KIÉNY, (214-215) il étudia l'influence de divers milieux nutritifs sur des cultures de gonades de Molgula manhattensis.

A la même époque, Emilienne WOLFF (260-261), travaillant également sur des Invertébrés marins, obtint l'implantation in vitro et la survie pendant une durée de quatre à douze jours, avec conservation de la structure caractéristique, de divers fragments d'organes de Limules Xiphosura polyphimus (fragments de coeur dorsal, de foie, du système nerveux, gonades, intestins).

En 1962-1963 Josette BERREUR-BONNENFANT (11-12) s'adressa aux Crustacés marins et explanta ainsi des gonades et la glande androgène d'Orchestia gammarella et de Talitrus saltator.

En 1963 DURCHON et SCHALLER (79), sur le même milieu, obtinrent des survies de huit jours à trois semaines de parapodes de quatre espèces de Néréidiens. Ces parapodes présentaient encore

en survie des contractions spontanées. Des études histologiques montraient que les tissus conservaient leur vitalité et leur structure normale. Si on explantait plusieurs parapodes, des phénomènes de soudure étaient observés.

La même année STREIFF et PEYRE (223), obtinrent aussi des survies de huit à dix sept jours de divers organes de Calyptaera sunensis.

Il est intéressant de noter, pour la suite de notre expérimentation, que les tentacules oculaires survivent dix sept jours sans aucun signe de nécrose, avec conservation des réflexes de contractions et présence de la ciliature externe très saine. Les cellules pigmentaires de l'oeil sont aussi en très bon état; par contre, des difficultés plus grandes sont rencontrées avec l'hépatopancréas.

D'autres chercheurs de la même école, en moins grand nombre, s'attaquèrent aux problèmes plus difficiles de la culture d'organes d'Invertébrés non marins, mais se limitèrent à l'étude de la culture de gonades.

C'est ainsi que FOOTE et FOOTE en 1961 (98) cultivèrent des ovaires d'Axolotes avec une durée moyenne de survie de deux semaines.

En 1962-1963 LENDER et DUVEAU-HAGEGE (156-157-158) s'adressèrent aux Insectes et cultivèrent pendant un maximum de quatorze jours, des gonades d'un Lépidoptère Galleria mellonella.

Enfin tout récemment (1964) GOMOT et GUYARD (112-118), adaptent cette technique à l'explantation des gonades de Gastéropodes pulmonés. Ils étudient ainsi la différenciation des gonades de jeunes Helix aspersa, et l'influence de divers facteurs nutritifs sur l'évolution de cette différenciation.

Dans les travaux conduits par la méthode de WOLFF et HAFFEN, les survies réalisées ne cherchent pas à être de longue durée et s'effectuent la plupart du temps sans renouvellement de milieu, les fragments d'organes mis en cultures sont de petites dimensions et le support solide à base de gélose toujours indispensable.

b) La culture organo-typique en milieu liquide.

Cette technique s'adresse à des organes ou fragments d'organes dans lesquels sont représentés toutes les structures caractéristiques de l'organe considéré. Au cours de la survie obtenue expérimentalement, on tente de reproduire dans les meilleures conditions

la continuation de la vie des tissus telle qu'elle se présente dans individu entier avec conservation de toutes les structures

Les organismes maintenus en survie par cette méthode, peuvent se mouvoir librement au sein du milieu de survie liquide, ils respirent, se nourrissent, se transforment mais ne se multiplient pas. Cette méthode est en quelque sorte intermédiaire entre la culture proprement dite et l'élevage.

Elle a surtout permis l'étude de la survie de petits organes d'Invertébrés et de Vertébrés inférieurs ; mais elle a aussi conduit jusqu'aux expériences de survie de gros organes par perfusions physiologique du système vasculaire.

C'est en réalité, la seule méthode de survie et non de culture, et c'est elle qui fait l'objet de nos travaux.

Les premiers essais de survie expérimentale conduits par cette méthode, peuvent être rapportés à VULPIAN en 1858 et en 1859 (253-254) lorsqu'il cherche à maintenir en survie des queues de têtard séparées de leurs attaches.

Mais les premiers résultats positifs furent décrits en 1909 par CARL GREEN (35) expérimentant sur les Actinies. Cet auteur put obtenir des survies de tentacules sectionnés à leur pointe, durant une à deux semaines, et constata déjà que les fragments libres diminuaient de taille et s'arrondissaient avant de mourir.

En 1916 E. SCHULTZ (201) signala la possibilité de survie, de pieds ambulacraires coupés ou arrachés sur l'Oursin, pendant des périodes d'au moins un mois et plus. Lui aussi remarqua la formation trois semaines après la mise en survie de sphères recouvertes d'un épithélium privé de cils, et remplies de cellules mésenchymateuses. Les muscles, dit SCHULTZ, se détruisent non par phagocytose, mais par dissolution, le système nerveux se conserve assez longtemps mais périt à son tour.

L'année suivante en 1917 BALTZER (4) observa que la trompe des Echiures séparée de l'organisme peut survivre un certain temps. Malheureusement cet auteur ne donna pas d'autres précisions.

Par contre en 1925, nous trouvons un travail très intéressant de J. ZWEIBAUM (273) travaillant à Varsovie. Cet auteur obtint la survie de l'épithélium vibratile des branchies d'Anodontes dans un liquide de Ringer dilué au 1/2, c'est-à-dire correspondant à un Δ° de - 0,15° ; le Δ° des tissus de l'Anodonte étant de - 0,20°. La survie est poursuivie à 12°-15° à l'obscurité.

Les explants se révélèrent très sensibles à trois facteurs : la pression osmotique, la température, la lumière.

Dans les conditions optima, une survie maxima de soixante trois jours sans changement de milieu, a pu être observée. Cependant dès vingt quatre heures après la mise en survie, la forme de l'explant change. Celui-ci tend à prendre une forme sphérique. Après quatre à six jours on ne trouve plus parmi les fragments ayant survécus, que des formations sphériques ou ovoïdes.

L'auteur écrit : dans tous les cas, on observe un déplacement et un groupement régulier des cellules épithéliales à la périphérie des fragments, les cellules internes restent dispersées sans aucun ordre. Ce groupement a pour but la formation de sphères épithéliales. Si les fragments sont plus longs. . . . ils subissent ensuite une fragmentation en deux ou trois formations sphériques ou ovoïdes. Celles-ci deviennent indépendantes le quatrième ou sixième jour".

Au cours de la survie on n'observait aucune prolifération cellulaire, ni des cellules épithéliales, ni des cellules conjonctives. L'auteur notait en cela, la différence avec les cultures de tissus. La multiplication des cellules épithéliales et lymphatiques était cependant intense pendant la formation des sphères (jusqu'au sixième jour), mais se faisait par voie amitotique.

Pour former ces sphères, les cellules cylindriques du bord libre du fragment envoient des prolongements au moyen desquels elles se réunissent. Il y a rapprochement des bords libres de la blessure, glissement de l'épithélium et épidermisation.

En 1932 Odette TUZET (245) conserva en survie en aquarium, pendant trois mois et demi, des trompes isolées de Bonellie qui continuaient à capter et à véhiculer des particules alimentaires, avant que les phénomènes de dégénérescence ne s'établissent. A l'obscurité ces trompes rampaient sur le fond du bac et conservaient des mouvements très actifs. Si la trompe était découpée en fragments la dégénérescence était rapide.

La même année J. André THOMAS (229-230) maintint en vie aseptiquement pendant des périodes de trois à six mois, dans du plasma homologue les urnes et les vésicules énigmatiques du Siponcle. Les urnes après trois mois étaient toujours en activité et se déplaçaient grâce à leurs cils vibratiles.

Puis à partir de 1939 cet auteur a étudié la possibilité de survie de toute une série d'organites prélevés chez les Invertébrés dont nous relèverons les principaux (231-242).

1° - Chez les Coelentérés.

Il note que, pour les tentacules d'*Anemonia sulcata* sectionnés et maintenus dans l'eau, la survie est de quatre jours ; la dégénérescence est progressive avec sécrétion abondante de mucus et libération de très nombreuses zooxantelles. Cependant ces tentacules conservent leurs contractions spontanées et leurs mouvements s'amplifient lors du renouvellement de l'eau.

Chez une actinaire *Adamsia palliata*, si on découpe en fragments les aconties rejetées lors de la capture par une pagure, ces fragments dégénèrent et meurent en quatre jours avec des phénomènes de décoloration.

Cependant dans certains cas des survies de vingt cinq et vingt sept jours ont pu être observées.

2° - Chez les Annélides polychètes sédentaires.

Les résultats les plus intéressants ont été obtenus dans la famille des Sabellidés.

Ainsi chez *Sabella pavonina*, les filaments branchiaux coupés sont doués d'une très vive activité durant le premier jour de leur vie autonome. Ils se tordent, s'enroulent en spires et se déplacent comme des millepattes. Les barbules grâce à leurs cils vibratiles continuent à rassembler et à agglutiner des particules et des grains de sable dans la gouttière située à leur basé, et par des mouvements coordonnés, les repoussent vers l'extrémité ovale du tentacule.

Mais dès le quatrième jour, une atrophie des barbules s'établit et évolue jusqu'au neuvième jour où elle conduit à la mort de l'explant.

Chez *Branchiomma vesiculorum* des phénomènes analogues sont observés. Les filaments sectionnés sont doués de mouvements propres ; ils se meuvent l'extrémité basale en avant, l'oeil en arrière. La dégénérescence et la mort surviennent dans un temps variable selon le filament considéré. La survie peut se poursuivre jusqu'à quatorze jours bien que la dégénérescence s'amorce précocement dès le deuxième jour.

Il est intéressant de noter que l'oeil conserve son aspect normal presque jusqu'au dernier moment.

3° - Chez les Echinodermes.

En 1941 s'ouvre une série d'expérimentation de J. André THOMAS (232) chez les Echinodermes. Cet auteur va étudier les

phénomènes de dédifférenciation structurale au cours de la survie chez un grand nombre d'organes ou fragments d'organes externes : (pédicellaires, tubes ambulacraires, tentacules, pédicelles, pinules) prélevés dans les cinq classes de cet embranchement : Echinides - Holothurides - Crinoïdes - Ophiurides - Stellérides.

Les pédicellaires d'Echinides ont des vitalités différentes selon leur provenance.

Les pédicellaires globifères pigmentés et les tridactyles sectionnés, chez Echinus acutus ont une vitalité faible (quatre jours), cependant ils conservent leur forme n'ayant pas eu le temps de commencer leur dédifférenciation et restent capables de pincer jusqu'à leur mort. Les petits pédicellaires globifères péribuccaux, non segmentés, sectionnés à la base de leur style, sur des péristomes déjà découpés, survivent mieux (neuf jours pour la plupart s'ils sont mis en survie en bon état). Cependant dès le quatrième jour une involution progressive se manifeste, elle se traduit chez les uns par l'enfouissement des valves et la transformation en ovoïde; chez les autres par le développement des pédicules en une masse hyperplasique arrondie autour du style calcaire. Cette masse peut être réséquée après sa formation (septième jour) et l'organe continue à vivre. La survie maxima a été de trente trois jours, avec des valves d'aspect normal capables de pincer fortement une aiguille et de rester suspendues à elle.

Chez Sphaerechinus granularis, les pédicellaires ont une meilleure vitalité ; les grands globifères survivent quatorze jours sans modifications apparentes, tandis que pour les tridactyles, l'auteur note au cours de la survie, qui peut se prolonger vingt huit jours, une certaine atrophie des pièces calcaires et la réunion des trois valves en un seul bloc. Certains des petits globifères péribuccaux de cette espèce se transforment en une sphérule pigmentée par enfouissement des valves sous un épiderme commun ; mais d'autres peuvent survivre jusqu'à quarante cinq jours sans changement notable ; leurs valves continuent à réagir au contact d'une aiguille.

Reprenant les travaux d'Eugène SCHULTZ sur les Echinides, J. André THOMAS, expérimente sur les tubes ambulacraires de Sphaerechinus granularis et constate qu'il maintient en survie treize jours des tubes ambulacraires isolés. Mais si, au cours de la section, il arrive fortuitement que ceux-ci se greffent par leur surface de section, la survie atteint vingt quatre jours. Cependant les phénomènes de dédifférenciation sont très précoces et l'auteur les décrit ainsi "Les zones d'implantation réciproques des tubes s'accroissent, puis disparaissent, noyées dans les tissus en remaniement, ceux-ci comblent peu à peu toutes les dépressions, les lobes bordant les ventouses s'effacent. Finalement l'ensemble dont la taille diminue beaucoup, constitue une masse globuleuse uniforme où les vestiges des ventouses sont difficiles à distinguer.

Après vingt à vingt quatre jours de survie l'épiderme des masses globuleuses résultant des tubes qui se sont greffés les uns sur les autres, est réduit à une couche de cellules aplaties peu nombreuses recouvertes d'une cuticule ; il existe des zones sans cellules, d'autres où les cellules ont fusionné, le pigment est peu abondant, il peut être réparti en amas irréguliers dans l'hypoderme ou être à l'état de grains dans les phagocytes isolés ... la masse centrale est formée de cellules libres, dont le noyau. contient des structures résultant de l'autolyse des muscles et du tissu conjonctif. Les fibres musculaires en effet ont en grande partie disparu laissant des sarcolytes disséminés".

Chez les Holothurides, des phénomènes analogues sont constatés, chez les pédicelles et les tentacules sectionnés (après anesthésie) d'Holothuria tubulosa, ou les arborisations de Cucumaria planci à condition que le fragment coupé soit de petite taille. Si les fragments sont trop gros, la coaptation des lèvres de la plaie se fait mal et il y a dégénérescence. La survie obtenue avec ces organes est de vingt huit jours. Jusqu'au douzième jour les contractions musculaires spontanées ou provoquées persistent mais la différenciation structurale s'installe d'autant plus vite que le fragment est plus petit. C'est toujours l'épiderme qui nivelle les surfaces, les ramifications de l'extrémité des tentacules perdent la finesse de leur contour et les disques adhésifs s'estompent. En fin de survie on retrouve une sphère indifférenciée de volume réduit, pourvue de sclérites et remplie de cellules de souches différentes, et de produits d'autolyse des muscles et du tissu conjonctif, avec des traînées ou des amas de pigment.

Chez les Ophiurides et les Crinoïdes l'auteur observe les mêmes phénomènes de différenciation et de tendance à l'organisation en sphères, mais la survie est de courte durée : quatre jours chez les tubes ambulacraires d'Ophiotrix fragilis, dix jours pour les fragments de pinnules de la partie terminale des bras d'Antedon mediterranea.

Les phénomènes de survie les plus intéressants chez les Invertébrés ont été étudiés par J. André THOMAS en 1941 (231) chez les Stellérides où certains organes séparés du corps peuvent garder leur forme et fonction jusqu'à la mort ; tels les tubes ambulacraires de quelques espèces d'Astéries spécialement Marthasterias glacialis dont la survie est de plus de vingt jours.

Des phénomènes de greffes peuvent se produire lors de la section comme chez les Echinides, mais ici les ensembles greffés gardent leur forme. La structure générale au vingtième jour de survie est convenablement conservée et les processus d'involution relativement peu accentués. Les glandes épithéliales existent encore, les cellules à venin sont un peu moins abondantes, les cellules à mucus

toujours présentes et plus ou moins sécrétrices. On note seulement une certaine atrophie et d'assez nombreuses picnoses.

Mais les phénomènes de vitalité les plus grands sont observés par l'auteur lorsqu'il isole des petits pédicellaires droits, dorsaux et latéraux d'Astérides. La cicatrisation se fait très vite après la section, et les petits organismes libres continuent à se défendre se contracter, se tordre, ouvrir et fermer leurs valves. Ces manifestations peuvent être conservées pendant plus de trois mois. Des coupes histologiques pratiquées au soixantième jour montrent que la structure à ce moment est encore assez voisine de la normale : la double musculature et le squelette des valves gardent leur aspect habituel, l'épiderme a conservé sa structure générale et indépendamment de quelques picnoses, une mitose a pu y être observée ; des petits granulomes dus à l'accumulation de restes de diverses proies et des grains de sable peuvent s'y voir, accompagnés de petites boules représentant la sécrétion des glandes à venin, les glandes à mucus, elles, sont en partie vidées ; la substance fibrillaire du tissu conjonctif du pédicule est intacte.

Des phénomènes de régénération peuvent même être observés chez ces pédicellaires en survie depuis vingt trois jours. Ceux-ci sont capables, après une régénération étendue sur dix jours, de survivre quarante trois jours, en gardant intact le squelette du porte-greffe.

Au cours de cette série d'expériences le milieu de survie des organismes était constitué par de l'eau de mer. J. André THOMAS cherchant à prolonger le temps de survie, entreprit alors de réaliser des survies en milieu enrichi à la fois en facteurs alimentaires (protéose-peptone-glucose-extraits d'organes) et en substances antibactériennes (p. aminophénylsulfamide) d'une part, et d'autre part régulièrement renouvelé.

Pour ces études l'auteur s'est adressé aux organes des Batraciens. Et c'est ainsi qu'en 1943, il explante des organes de têtards de Grenouille dans diverses solutions salines : Ringer pour Poikilothermes ou liquide de Holtfreter.

Ce dernier liquide lui permet de maintenir en survie pendant quelques jours des queues de têtards de six à sept millimètres de long, qui continuent à croître et à se mouvoir jusqu'au cinquième jour, puis dégèrent rapidement.

En 1947 J. André THOMAS (239) met au point un milieu nutritif et antiseptique qu'il propose comme moyen d'analyse morphogénétique. Ce milieu se compose d'une solution physiologique tamponnée, d'une solution antibactérienne (p. aminophénylsulfamide et pénicilline) et d'une solution nutritive à base de cystéine, d'acides aminés,

des deux acides nucléiques et de l'acide ascorbique. Il lui permet de maintenir en survie trois à quatre semaines des petits organes prélevés chez les Urodèles adultes : (*Triton cristatus*, *T. vulgaris*, *T. palmatus*, *Salamandra maculosa*) (J. André THOMAS et J. BORDERIOUX 1947-1948) (241-242).

Chez les organites et fragments pourvus d'un squelette (doigts entiers, fragments de membres), on observe peu de modifications de la forme au cours de la survie. Dans le milieu complet, les doigts en survie se maintiennent en bon état dix à quinze jours, puis les tissus internes commencent à dégénérer ; les cellules glandulaires se vident, les grains de mélanine sont libérés des mélanocytes, les muscles perdent leur striation, la substance collagène se développe, la vascularisation persiste longtemps. La survie des fragments de doigts peut ainsi atteindre vingt sept jours.

Par contre chez les fragments sans armature squelettique (jeunes blastèmes de régénération, branchies de larves), on assiste à une différenciation structurale, qui aboutit à la formation de masses globuleuses. La survie est plus courte (trois semaines), mais au bout de cinq à huit jours les explants diminuent de volume et une lente autolyse interne débute.

Quelquefois au contraire, on assiste à une évolution lamellaire comparable à celle obtenue en culture de tissus.

La cicatrisation de la plaie est toujours rapide dans les cas de petites plaies, mais dans les cas de plaies plus grandes les tissus profonds sont recouverts d'une nappe de faisceaux et de fibres collagènes.

Au cours de la survie les fragments de membres embryonnaires et adultes, rénovent et régularisent leur épiderme. Les mues ont pu être observées dès la fin de la première semaine de survie, et trois mues successives ont pu s'opérer chez le même fragment.

Enfin la composition du milieu joue un rôle dans le maintien de la survie et l'évolution morphogénétique.

Application aux organismes parasites.

Ces méthodes de survie en milieu liquide nutritif, antiseptique renouvelé ont été appliquées, surtout depuis quelques années, à des organismes entiers. Les travaux des expérimentateurs ont spécialement porté sur le maintien en survie hors de l'organisme, dans des milieux appropriés, de larves ou d'adultes de parasites, principalement des Helminthes.

Avant la mise au point de la technique de J. André THOMAS, ces travaux avaient été précédés de tentatives de maintien en survie d'organismes entiers dans des milieux liquides naturels ou artificiels mais sans adjonction d'antibactériens.

Ainsi COUTELEN en 1927 (55-56-57) a obtenu le développement de scolex et de capsules prolifères de *Taenia echinococcus* dans du liquide hydatique de Cheval ou de Boeuf additionné ou non d'extrait globulaire ; puis en 1928-1929, il maintint en survie pendant douze à quinze jours des embryons de *Filaire* provenant du sang de Grenouille, dans des milieux composés : (liquide de Pouselle, milieu Noxy-Neal-Nicolle+dextrose, extrait d'organes ou extrait globulaire).

DESCHIENS et PICK en 1948 (68), reprirent ces tentatives et conservèrent en survie des Doves de l'espèce *Watsonius watsoni* dix huit jours sur un milieu mixte constitué par de la gélose à l'extrait de foie de Boeuf et de l'eau physiologique, et pendant treize jours dans un milieu purement liquide : sérum de Cheval + Ringer.

Ce n'est qu'aux environs de 1950, que les auteurs cherchèrent à se mettre en milieu stérile. Des tentatives de cultures axéniques de Nématodes parasites, furent effectuées ensuite, sur milieux composés par DOUGHERTY et coll. (71) et par STOLL en 1953 (221).

WEINSTEIN (256), puis WEINSTEIN et JONES en 1953 (257), obtinrent le développement à partir d'oeufs, d'adultes de *A. caninum*, d'*A. duodenale* et de *Nyphostomum muris*, sur un milieu nutritif additionné de pénicilline et de streptomycine.

A partir de cette époque de très nombreux travaux sur le développement in vitro des Helminthes parasites furent effectuées. Citons chronologiquement quelques uns de ceux-ci : les premiers, NEWSON et ROBINSON en 1954 (183) travaillent sur *S. mansoni*, puis SILVERMAN en 1959 (216) sur *Haemonchus contortus*.

De 1956 à 1962 SENFT et coll. (207-208) réussissent des survies chez les Schistosomes immatures avec accroissement de taille et phénomènes de régénération dans un milieu régulièrement renouvelé, et comprenant une solution physiologique : (solution de Hanks), une solution nutritive : (liquide amniotique bovin + extrait d'embryons de Bovin + sérum de Cheval) et des antibiotiques.

Ces travaux sur la survie des Schistosomes sont poursuivis par ROBINSON (197), CLEGG (49) et NEWSOME (182) qui, tous cherchent le milieu le plus favorable à la survie. LELAND en 1961-1963 (154-155) étudie la croissance et le développement de divers Nématodes parasites, sur le même milieu proposé par SILVERMAN.

Au cours de l'année 1962, DOUVRES (72-73-74) publie une série de recherches sur le maintien en survie dans différents milieux de larves ou d'adultes de parasites du bétail, Cooperia punctata, Stephanurus dentatus et Oesophagostomum radiatum.

La même année, des survies "in vitro" d'Ascaris lumbricoïdes sont effectuées dans des milieux salins enrichis de facteurs nutritifs et d'antibiotiques, tant par des auteurs anglo-saxons CLEELAND et KENNETH (47-48), que par des auteurs français CAVIER et SAVEL (38).

Si nous avons fait une distinction entre les deux méthodes de culture organo-typique, distinction basée sur des différences réelles dans les procédés et les buts, il arrive que certains expérimentateurs modernes, pour des recherches particulières, utilisent une technique relevant à la fois de ces deux méthodes. Telles les expérimentations de DEMAL en 1956 (65), et DEMAL et LELOUP en 1963 (66), qui tentent d'obtenir la survie, la croissance et la différenciation des ébauches imaginaires de Drosophila melanogaster et de Calliphora erythrocephala, en goutte pendante dans un milieu liquide renouvelé quotidiennement et contenant trois parties : une solution physiologique, une solution nutritive (extrait d'embryons de Poulet + extrait de pupes), des bactériostatiques (Pénicilline).

Puis en 1958 celles de FREISLING et REISINGER (100) qui étudient la formation de "sphérules de restitution" à partir de fragments d'épiderme de Planaires dans un milieu liquide.

Enfin en 1963 R. GAY (109) entreprend de cultiver in vitro des fragments de Lumbricoïdes, dans le but de rechercher quelles transformations cellulaires interviennent dans la formation des blastèmes et dans la fermeture des blessures qui ne sont pas suivies de régénération. Il utilise un milieu complexe composé d'un milieu solide constitué par de la gélose à 1 % en solution de Tyrode, d'une solution nutritive, et d'antibiotiques. Les fragments sont prélevés chez des organismes jeunes ou adultes, jamais embryonnaires, et survivent dans de telles conditions, sans phénomène de croissance.

L'auteur envisage pour la poursuite de ses travaux d'étudier le comportement de tels fragments baignés par le milieu afin d'obtenir une dédifférenciation généralisée. Cette méthode présentera tous les caractères de la technique mise au point par J. André THOMAS.

Les travaux entrepris également en 1963, par CHANDEBOIS (40) sur des fragments de Planaires d'eau douce sont aussi à rapprocher des deux techniques. L'auteur travaille sur des fragments de Planaria subtentacula et réalise trois types de "cultures" - 1°) Culture sur gélose recouverte de milieu nutritif liquide - 2°) Culture sur gélose à sec - 3°) Culture en milieu liquide seul.

Le milieu liquide est constitué de trois parties : solution physiologique, solution nutritive, antibiotiques.

Si la première technique se rapproche de la méthode de WOLFF et HAFFEN, la méthode utilisant des explants placés en milieu liquide se rattache à la technique de J. André THOMAS.

En effet, dans de telles conditions, l'explant est capable de se déplacer dans le milieu et de se contracter. La cicatrisation ne se fait pas et l'explant engendre une sorte de blastème qui n'est pas enveloppé d'épiderme et ne se différencie pas. Ces blastèmes sont différents des blastèmes normaux, ils ont une forme sphérique et sont très fragiles. Au bout de cinq à six jours de mise en culture, l'épiderme de l'explant devient irrégulier et l'aspect général change, cependant les tissus restent vivants ; finalement l'explant se résout en amas cellulaires nombreux et irréguliers capables de survivre encore une semaine.

Les changements de milieu que l'auteur aimerait réaliser, se sont montrés très difficiles du fait de la rapide dédifférenciation du parenchyme qui se dissocie. De plus les cellules différenciées de manière irréversible lors de l'explantation ne peuvent être remplacées au cours de la survie.

Ainsi donc, si les méthodes de survie diffèrent dans leurs réalisations techniques particulières, les grands principes de base sont semblables. Le maintien de la vie a des exigences essentielles. Cependant chaque objet biologique a ses problèmes propres, et les méthodes, quelque-elles soient, doivent être adaptées aux besoins particuliers de l'organe explanté.

C'est pourquoi, pour la réalisation de la survie de nos explants de Planorbes, si les principes de base sont ceux de la méthode de culture organo-typique de J. André THOMAS, certaines modifications ont été rendues nécessaires par la nature même du problème posé.

CHAPITRE II.

MATERIEL et METHODES

A - MATERIEL

Dans ce travail, nous nous sommes donc proposés d'étudier la pénétration et le devenir de la larve infestante libre (miracidium) d'un Trématode *Schistosoma mansoni*, dans des explants de Mollusques hôtes-vecteurs, maintenus en survie.

Nous rappellerons brièvement le cycle de ce Trématode.

Cycle de *S. mansoni* : Schéma fig. (1)

L'oeuf de Schistosome contient une larve ciliée (miracidium) qui sous l'effet de certaines conditions (chaleur-lumière, concentration saline) est libérée dans l'eau et pénètre un Mollusque aquatique spécifique. Le miracidium évolue, alors, à l'intérieur des tissus du Mollusque en sporocystes, qui, ayant atteint un stade mobile, migrent vers l'hépto-pancréas du Gastéropode. Après maturation, survient la libération par effraction, de Cercaires à queues bifides, formes aquatiques très mobiles, infestantes pour les Mammifères et l'Homme. Elles pénètrent à travers les téguments et, par migration atteignent les territoires veineux mésentériques, où elles deviennent adultes. Les adultes après accouplement pondent des oeufs, qui sont rejetés à l'extérieur avec les déjections.

LE MOLLUSQUE (fig. 2)

Le Mollusque dans le cycle des Trématodes est le premier hôte intermédiaire qui permet le développement des différents stades larvaires aboutissant à la formation de la larve infestante pour les Mammifères et, dans certains cas, pour l'Homme. L'étude de sa spécificité vis-à-vis du parasite, et de l'évolution des différents stades larvaires à l'intérieur de ses tissus, est donc primordiale.

Pour notre étude, nous nous sommes adressés à des Mollusques d'eau douce qui, du point de vue systématique, peuvent être définis ainsi :

Embranchement	: Mollusques
Classe	: Gastropoda
Sous-classe	: Pulmonés
Ordre	: Basommatophora
Famille	: Planorbidae
Sous-famille	: Planorbinae
Genre	: Planorbis
Espèces	: <u>Australorbis glabratus</u>
	: <u>Planorbis corneus</u>

Ce sont donc des Mollusques Gastéropodes, caractérisés par une coquille enroulée en spirale, plane, sans opercule et par une seule paire de tentacules. Ils sont hermaphrodites et les orifices génitaux sont localisés à gauche.

Dans cette famille nous avons utilisé deux genres :

- 1) Le genre Australorbis, espèce glabratus, qui est vecteur de la Bilharziose: souches des Caraïbes, Brésil et Porto-Rico.
- 2) Le genre Planorbis, espèce corneus, qui se rencontre dans nos régions et n'est pas vecteur.

D'autre part parmi les Planorbis glabratus, les souches présentent des spécificités très strictes selon leur provenance. C'est ainsi que la souche brésilienne est réfractaire aux Schistosomes provenant de Porto-Rico et vice versa, bien que chacune d'elles soit douée d'un très haut pouvoir d'infestation par les Schistosomes dans leur région propre.

Nous avons fait des essais comparatifs avec trois de ces souches pour en étudier la spécificité.

Les individus des trois souches d'A. glabratus étaient issus d'élevages entretenus au laboratoire ; les sujets étaient choisis sains et n'ayant jamais été infestés par les Schistosomes.

Les specimens de Planorbis corneus provenaient des ruisseaux du Bois de Boulogne.

Notre propos n'étant pas une étude propre aux Mollusques, nous nous contenterons de rappeler sommairement certaines structures dont la connaissance nous sera utile au cours de notre étude.

Le système nerveux.

Le système nerveux du Planorbe est très voisin de celui de l'escargot Helix pomatia. Nous en rappellerons brièvement la composition : un collier ganglionnaire central, un ganglion périphérique, des cellules ganglionnaires individuelles, des nerfs. Le collier nerveux péri-oesophagien est situé, et les ganglions répartis comme chez Helix pomatia, cependant il y a pratiquement quasi fusion des ganglions au-dessus de l'oesophage, pour aboutir à la formation d'un ganglion unique, le ganglion cérébral ou cérébroïde.

Les cellules ganglionnaires sont situées à la périphérie des ganglions, sauf à la racine, où les cellules ganglionnaires manquent. Le centre du ganglion contient des neurofibrilles. Il ne paraît y avoir qu'un ganglion périphérique chez A. glabratus, associé à l'osphradium. Il n'y a pas de ganglion à la base des tentacules.

La constitution des nerfs des Planorbes est très semblable à celle des nerfs d'Helix pomatia. On note des neurofibrilles entourées de périneurium et la persistance du tissu épineurium le long du nerf. Ce dernier tissu est quelquefois très réduit en épaisseur et n'est formé que d'une seule couche de cellules.

Dans le tentacule les fibres sont en général parallèles et longitudinales dans le sens du tentacule. Cependant, il existe quelques fibres transverses ou circulaires.

L'oeil du Planorbe a une structure semblable à celle des yeux de Gastéropodes décrite par SMITH (1906) et BAEKER (1932), c'est-à-dire qu'il se compose des parties suivantes :

- Une capsule optique constituée par une gaine de tissu conjonctif qui s'épaissit au niveau du nerf optique pour se confondre avec l'épéneurium de ce dernier.

- La cornée, constituée par un épithélium squameux non pigmenté.

- La rétine formant avec la cornée un sac fermé renfermant l'humeur vitrée et les lentilles.

Entre la cornée et l'épithélium de la tête, il y a un petit espace rempli d'une humeur contenant des amœbocytes. La cornée est en contact étroit avec les lentilles sur la surface interne et avec la capsule optique à la surface externe.

La rétine est composée de deux catégories de cellules : les sensorielles et les pigmentées. La zone externe contient les cellules

réтиниennes nucléées, mais non pigmentées, la zone médiane, les cellules pigmentées, la zone interne les racines des cellules sensorielles réceptrices de la lumière ; elle est en liaison avec l'humour vitrée.

Choix de l'explant.

Le choix du tentacule, comme explant, s'est imposé par la facilité de sa section, la présence d'un épithélium cilié servant de critère de survie et la pénétration préférentielle du miracidium dans cet organe.

Le tentacule (fig. 4) (Pl. I fig. 5-6)

Chez le Planorbe de la famille des Planorbinae, il n'existe qu'une seule paire de tentacules situés de part et d'autre de la région frontale de la tête.

Ces tentacules, organes éminemment contractiles, ont la forme d'un cylindre allant en s'élargissant vers la base pour former d'un côté une excroissance en forme de feuille. Dans le pli de cette excroissance sont situés les yeux (fig. 5 et 6, Pl. I).

Ce sont des organes sensoriels, très mobiles dont toute la surface est recouverte de cils vibratiles. La mesure d'une section circulaire au niveau médian donne des chiffres de 525-630 microns. En coupe, en allant de l'extérieur vers l'intérieur, on trouve les éléments suivants :

- a) Un épithélium de revêtement portant de nombreux cils,
- b) Des sinus sanguins,
- c) Un tissu conjonctif dense. Ce tissu est en relation étroite avec l'épithélium par des traînées de fibroblastes qui constituent également les limites des sinus sanguins.
- d) Une artère centrale desservant les sinus.

En outre, on note la présence de nombreuses fibres musculaires longitudinales, des cellules à pigment réparties dans tout le tentacule mais spécialement abondantes dans le tissu conjonctif et des cellules à mucus dispersées dans le tissu conjonctif.

Les tentacules sont des organes très richement innervés. Un tronc nerveux issu du ganglion cérébral du collier péri-oesophagien les parcourt dans toute leur longueur. De nombreuses petites et fines ramifications latérales relient le tronc nerveux central à l'épithélium de surface.

Les mouvements de contraction sont régis par l'état des sinus sanguins, l'extension étant produite grâce au remplissage de ceux-ci par l'hémolymphé en provenance de l'artère centrale, la rétraction par la contraction des muscles qui vident les sinus de l'hémolymphé qui s'y trouvait. Les cellules vésiculaires jouent le rôle de support élastique.

LE MIRACIDIUM (fig. 3)

Le miracidium est l'embryon infusiforme, issu directement de l'oeuf des Bilharzies, qui éclot dans l'eau sous certaines conditions de température et d'éclairement, et représente la forme infectante pour les Mollusques vecteurs.

C'est une larve ciliée douée de grande mobilité avec un phototropisme marqué et un géotropisme négatif. Sa taille est très difficile à apprécier, car il est doué d'une grande plasticité. Sa forme peut varier beaucoup. Cependant, on peut donner comme valeur moyenne 156 microns de long sur 50 microns de large.

Lors d'un examen rapide, il apparaît comme entièrement bordé de cils, cependant la partie antérieure en est complètement dépourvue, et constitue l'organe de pénétration qui contient les glandes céphaliques. C'est la "papille antérieure" ou "terebratorium".

Chaque miracidium contient 40 à 50 cellules germinatives surtout localisées à la partie postérieure sous la masse nerveuse et de nombreux petits agglomérats de granules très réfringents, répartis anarchiquement et de signification encore mal définie.

Ces cellules germinatives et ces granules se retrouvent dans les sporocystes qui constituent les phases évolutives du miracidium dans le Mollusque.

Les miracidiums sont doués d'une longévité très réduite, celle-ci est fonction de la température et de l'éclairement, ces deux facteurs influant sur la mobilité.

La durée de vie moyenne, à 20° en eau de fontaine sous éclairage normal, est de neuf heures. Elle peut augmenter jusqu'à vingt quatre heures, si l'on maintient la larve en vie ralentie à + 4° à l'obscurité (BENEX 1963) (9). Le pH optimum de survie se situe entre 7,5 et 8,5.

Evolution du miracidium à l'intérieur du mollusque hôte.

Au cours de sa phase libre, la larve, pour poursuivre son développement, doit rencontrer un Mollusque vecteur. L'"attraction" du miracidium par le Mollusque n'est pas encore élucidée.

Nous discuterons de ce problème au cours de notre étude ultérieure. Toutefois, le miradium se fixe sur le Mollusque et pénètre à l'intérieur de son hôte ; les cellules germinatives se multiplient et en l'espace de vingt quatre heures donnent un sporocyste mère généralement rond.

Vers le dix-huitième jour, les sporocystes mères ont donné naissance à de nombreux sporocystes filles de forme allongée, qui migrent vers l'hépto-pancréas et la glande hermaphrodite où ils s'immobilisent définitivement. A partir de la troisième semaine, une deuxième multiplication des cellules germinatives à l'intérieur des sporocystes filles conduit à la formation des Cercaires, (trois stades d'évolution).

Dans certains cas, à la limite de la normale, il est possible d'avoir une évolution complète du miracidium en sporocystes filles au lieu de pénétration sans migration.

B - METHODES

1° - Méthode de la survie de l'explant.

Nous développerons ultérieurement les résultats expérimentaux de l'étude de la survie de nos explants, mais nous donnerons ici le schéma de la méthode de survie et la composition du milieu final.

Nous avons été amenés à utiliser la technique de culture organo-typique en milieu solide pour l'étude des sécrétions des explants. Cependant les tentacules soumis aux conditions expérimentales de cette méthode - c'est-à-dire déposés sur un support solide constitué par de la gélose à 1 % dans la solution de survie - n'ont survécu que quelques jours, 3 ou 4 au maximum.

Pour obtenir une survie suffisante, nous avons donc dû employer la méthode de survie en milieu liquide de J. A. THOMAS.

a) Principe de la méthode de survie

La méthode de survie utilisée est une application de la méthode de survie expérimentale en milieu nutritif renouvelé, décrite et mise au point par J. André THOMAS en 1941 (231). La méthode de J. André THOMAS permet la survie de divers petits organismes d'Invertébrés et de Vertébrés inférieurs, elle a l'avantage d'être simple, intermédiaire entre la culture et l'élevage, et de répondre aux critères de notre expérimentation.

Le principe général de la méthode est le suivant : de petits organes ou fragments d'organes sont coupés nettement d'un seul coup de ciseaux rapide au niveau d'une région anatomique convenable, puis les organes sont portés dans une enceinte (petites boîtes ou tubes) contenant 20 ml de liquide de survie. Tous les jours les petits organes sains sont transportés dans un milieu neuf.

La composition du milieu de survie a été définie par J. André THOMAS en 1947 (239) ; celui-ci comprend trois parties : une solution physiologique tamponnée dont la quantité de NaCl peut varier selon la concentration moléculaire désirée, une solution d'antibactériens dont les doses sont calculées de telle sorte que l'on obtienne une action bactériostatique suffisante, mais non absolue, sans altérer la morphogenèse ; enfin la solution nutritive comprenant des acides aminés, les deux acides nucléiques et de l'acide ascorbique.

Au cours des premiers travaux de J. André THOMAS et de ses collaborateurs, ni le milieu, ni les organes, ni les instruments ne sont aseptisés. La conservation biologique se fait en milieu non stérile.

Pour notre part, nous avons été amenés à envisager l'introduction dans notre milieu nutritif d'antibiotiques choisis avec soin.

b) Composition du milieu de survie.

Le milieu de survie doit comprendre trois éléments : une solution physiologique synthétique tamponnée, des antibactériens, une solution nutritive.

La solution physiologique correspondant aux besoins des tentacules, doit se rapprocher du milieu interne des Australorbis, ne pas dépasser les limites de toxicité fixées pour les Planorbes vivants, être équilibrée, tamponnée, ajustée à pH 7,6 et stérilisée.

Les antibactériens, après de nombreux essais préliminaires, seront représentés par un mélange de colimycine à la dose de 80 μ g/ml et de tétracycline à 50 μ g/ml ; les antibiotiques et antimycosiques utilisés habituellement dans les cultures de tissus s'étant avérés extrêmement toxiques pour nos explants.

Notre solution nutritive, outre du glucose, contient des acides aminés fournis par une solution d'hydrolysate de caséine préférée à la lactalbumine et additionnée de glycocolle, des éléments soufrés, apportés par la cystéine, un complexe vitaminique sous forme d'extrait de levure de l'Institut Pasteur, et de l'acide ascorbique. A ces éléments fondamentaux l'addition d'A. T. P. aussi bien que d'extraits totaux de Planorbes utilisés à des concentrations variées, n'a conduit qu'à des différenciations structurales accélérées, ou à la mort pres-

que immédiate des explants. Par contre, de bons résultats sont obtenus par l'emploi d'extraits musculaires de Planorbes préparés par broyage sous congélation, additionnés de sang total des Mollusques et ajoutés au milieu dans la proportion optima de 10 %.

Ainsi donc la composition finale de notre milieu de survie s'établit ainsi :

	(Cl Na	: 3,25	gluconate de Ca 2,40
Solution physiologique (Cl K	: 0,25	bicarbonate de Na 0,20	
équilibrée		+ rouge de phénol,	
g pour 1.000	(SO ₄ Mg	: 0,08	
	(PO ₄ NH ₄) ₂	: 0,10	
	(PO ₄ H ₂ K	: 0,02	
Solution nutritive	(Glucose	1,00 g / ‰	
	(caséine	0,50	
	(cystéine	0,20	
	(glycocolle	0,20	
	(ac. ascorbique	0,02	
	(levure	1,00	
Extrait musculaire total :	10 %		
Colimycine	80 µg/ml		
Tétracycline	50 µg/ml		

En pratique :

La solution saline se compose de trois solutions :

1) Solution A contenant :

Cl Na	3,25 g pour 1.000
Cl K	0,25
SO ₄ Mg	0,08
PO ₄ H Na ₂	0,10
PO ₄ H ₂ K	0,02

préparée en solution mère deux fois concentrée, que l'on dilue au moment de l'emploi.

TABLEAU DE LA COMPOSITION DU MILIEU DE SURVIE

000

I - Solution physiologique composée de trois parties.

Solution A.		Solution B.		Solution C.		
ClNa	3,25 g / 100	Préparée en solution-stock 2 fois concentrée et stérilisée par filtration	Gluconate de Ca	2,40 g / 100	Bicarbonate de Na	0,20 g / 100
ClK	0,25 g					
SO ₄ Mg	0,08 g			préparé en ampoules stériles dosées pour 250 ml de milieu final.	additionné de rouge de Phénol et préparé en ampoules stériles	
PO ₄ HNa ₂	0,10 g					
PO ₄ H ₂ K	0,02 g					

II - Solution nutritive composée de quatre parties.

Solution D.		Solution E.		Solution F.		Solution G.	
Glucose	1 g / 100	Caséine	0,50 g / 100	préparée en solution stock concentrée, stérilisée, par filtration et ramené à la neutralité par NaOH N/10	Extrait de levure	1 g / 100 préparé en ampoules stériles de 1 ml = 1 g	Extrait musculaire + sang + fœtus de Placenta + norbe préparé stérilement.
préparé en ampoules stériles de 1 ml = 1 g		Cystéine	0,20				
		Glycocolle	0,20				
		Acide ascorbique	0,02				

La solution contenant les antibiotiques est préparée extemporanément de façon à obtenir 20 mg de Colimycine et 13 mg de Tétracycline dans 1 ml.

La préparation de solutions-stock concentrées, permet la conservation à la glacière pendant plusieurs mois et facilite la préparation des solutions finales.

Le milieu final est préparé par 250 ml à chaque fois, en mélangeant les solutions dans l'ordre suivant :

sol. A x 2 : 125 ml + E.D. stérile 105 ml + Sol. B et C : 1 ampoule + Sol. D : 1 ml + Sol. E x 25 : 10 ml + Sol. F = 0,25 ml + Antibiotiques : 1 ml. Le pH final est ajusté à 7,6 par addition de NaOH N/10.

L'extrait musculaire est introduit directement dans chaque tube de survie (0,5 ml pour 5 ml).

Les phosphates sont pesés et dissous à part, et ajoutés au mélange salin après dissolution complète. Cette solution A est stérilisée par filtration sur filtre de polystyrène et conservée à la glacière.

- 2) Solution B. gluconate de Ca 2,40 ‰ préparé en ampoules stériles, dosées pour 250 ml de milieu final.
- 3) Solution C. Bicarbonate de Na 0,20 ‰, additionné de rouge de phénol et préparé en ampoules stériles dosées pour 250 ml de milieu final.

La solution nutritive,

Elle est réalisée en quatre parties :

- 1) solution D. Glucose 1 g préparé en ampoules stériles de 1 ml.
- 2) solution E. Les acides aminés et l'acide ascorbique.
- 3) solution F. Extraits de levure.
- 4) solution G. Extraits musculaires.

Les antibiotiques.

La solution contenant les antibiotiques est préparée extemporanément. Elle est additionnée au milieu, au moment de l'emploi et la solution finale est ajustée à pH = 7,6 à l'aide d'une solution de Na OH N . La composition du milieu de survie est résumée dans le

10

tableau ci-après.

c) Evolution de la survie

Pour diminuer la contamination du milieu de survie, compte tenu de la sensibilité souvent très grande de l'Australorbis aux antibactériens et aux antibiotiques et après plusieurs essais portant sur l'effet de divers antiseptiques, notre choix s'est porté, pour une désinfection préalable du Planorbe entier, sur une immersion de dix minutes dans une solution de furadofne saturée et filtrée.

Après rinçage du Mollusque à l'eau stérile, l'explant constitué par le tentacule en extension est sectionné sous la loupe binoculaire, près de sa base, d'un coup de ciseaux rapide et net, prélevé à la pipette Pasteur rodée stérile et immédiatement transféré dans une petite boîte de Petri contenant 5 ml de la solution saline de survie, pour un dernier lavage. Il est ainsi débarrassé des quelques grosses souillures pouvant être restées accrochées dans les cils vibratiles. Puis il est porté, toujours à l'aide d'une pipette Pasteur rodée et

stérilisée (toute manipulation avec des objets en métal est évitée) dans un tube dit "tube à lamelle" contenant 5 ml de milieu complet où se poursuivra la survie.

Ces tubes sont préalablement soigneusement lavés, rincés à l'eau distillée stérile, stérilisés à l'autoclave et bouchés au caoutchouc gris.

Les tubes ont été préférés aux boîtes de Petri par suite de la décomposition spontanée du bicarbonate et des modifications concomitantes du pH dues à leur emploi. La face plane de ces tubes permet d'autre part une observation commode à la loupe binoculaire.

Le changement de milieu est effectué, en général tous les jours ou tous les deux jours, mais en tout cas, dès que le pH du milieu indique une acidification par la variation de l'indicateur coloré ; le pH au départ étant de 7,6, le changement de milieu s'effectue pour un $\text{pH} = 6,9 - 7$.

Lors de chaque changement de milieu le tentacule est transféré dans un nouveau tube contenant du liquide de survie frais. Entre les deux passages dans les tubes, il est porté dans une petite boîte de Petri contenant quelques ml de milieu, et nettoyé, si besoin est, à l'aide d'un pinceau très fin ou de deux effilures de pipettes rodées à l'aide desquelles on le débarasse de la gangue microbienne qui l'entoure. Cette opération de nettoyage n'est en général utile qu'aux premiers jours de la survie. Ensuite s'établit une stérilisation suffisante pour éviter cette opération.

Les critères de survie sont :

Mobilité de l'explant. Contractions musculaires
Battements des cils vibratiles
Acidification du milieu

La température optima est de 23°, au-dessus, la prolifération bactérienne augmente, au-dessous, la vitalité de l'explant diminue.

2° - Technique pour l'obtention des miracidiums de Schistosomes

Les miracidiums utilisés proviennent de l'éclosion d'oeufs de Schistosomes de *S. mansoni* de trois souches différentes, "Caraïbes", "Brésil" et "Porto-Rico". Ils sont recueillis à partir des foies, ou du contenu intestinal de Hamsters, après une période d'infestation de six semaines à deux mois par des cercaires de la souche correspondante ; cercaires au nombre de 300 à 400 par animal.

L'éclosion est obtenue en eau de fontaine, sous lumière artificielle, dans un flacon de Mac Müllen muni d'un cache opaque, après lavage des oeufs en eau physiologique froide.

La concentration des larves est réalisée grâce à la tubulure latérale et à la direction du faisceau lumineux.

Les miracidiums étudiés sont prélevés dès leur éclosion et dans une limite de temps ne dépassant pas une demi-heure, après la mise en place du flacon. Le prélèvement se fait à l'aide d'une pipette Pasteur effilée.

3° - Technique d'infestation des explants par les miracidiums.

Lorsque l'on veut réaliser l'infestation d'un explant, celui-ci est prélevé de l'enceinte où se poursuit la survie, et porté dans une boîte de Petri contenant 5 ml du milieu. Un nombre connu de miracidiums fraîchement éclos est introduit à la pipette Pasteur dans la boîte de Petri, et les phénomènes d'attraction et de pénétration suivis à la loupe binoculaire à travers le couvercle. Une fois la pénétration effectuée l'explant est repris à la pipette Pasteur et reporté dans une nouvelle enceinte de survie.

4° - Etude histologique des explants.

a) Fixation

Choix d'un fixateur :

Le premier problème qui se soit posé à nous pour l'étude histologique des explants est le choix d'un fixateur approprié. En effet les tissus des Mollusques ne réagissent pas d'une façon analogue aux tissus des Vertébrés.

Pour l'étude purement histologique nous avons expérimenté un nombre important de fixateurs usuels. Outre la compatibilité avec les tissus des Planorbes, le fixateur choisi doit convenir aux méthodes de colorations sélectionnées par ailleurs.

Les fixateurs à base de liquide de Bouin : Bouin simple ou Bouin-Hollande nous ont donné d'assez bons résultats. Les fixateurs à base de formol-pyrogallol ou hydroxybenzène par contre, ne nous ont apportés aucun avantage. Aussi nous sommes nous bornés à utiliser le plus simple : le formol à 10 % isotonique au milieu intérieur des Planorbes ou le Bouin-Hollande au sulfate de cuivre.

b) Méthodes de coloration.

De nombreuses colorations trichromes : trichrome de Masson, hémalum trichrome, hématoxyline-vert lumière etc... furent essayées et adaptées aux tissus des Mollusques, en vue d'obtenir de meilleurs résultats. Toutefois les deux colorations trichromes auxquelles nous nous sommes arrêtés sont, sinon les plus belles du

point de vue coloris, du moins les plus fidèles dans la différenciation des tissus. Ce sont la méthode à l'hémalum éosine safran, et la double hématoxyline phosphomolybdique au dioxane décrite par J. André THOMAS.

La durée des divers temps de coloration a été légèrement diminuée de façon à adapter ces méthodes aux tissus des Planorbes.

Avec la coloration à l'hémalum-éosine-safran, les noyaux sont bleu foncé, les cytoplasmes rosé ou saumon, les fibres musculaires rose franc vif, les fibres conjonctives jaune d'or ; les fibres nerveuses elles-mêmes apparaissent en rose.

La méthode à l'hématoxyline de J. André THOMAS (*) est élective pour la coloration des structures collagènes et réticulaires. Avec cette coloration les noyaux sont colorés en noir bleuté, le collagène et la réticuline en violet intense, les cytoplasmes en vert plus ou moins jaunâtre ; les fibres nerveuses apparaissent également en noir franc.

Cette coloration trichrome présente de multiples avantages sur les trichromes habituels, en ce qu'elle est très sélective, beaucoup plus fine, rapide, fidèle et simple. Elle nous a donné d'aussi bons résultats avec les tissus d'Invertébrés qu'avec les tissus de Vertébrés.

En résumé la technique de l'étude histologique des explants de Planorbes peut se traduire ainsi :

- Fixation au Bouin-Hollande ou au formol à 10 % neutralisé et isotonique à 4 ‰ (concentration ionique égale à celle du milieu interne de Mollusques).

Inclure à la paraffine :

couper au 1/200,

collage en eau gélatinée,

collodionner les coupes,

colorer a - les noyaux à l'Hémalum ou Hématoxyline ferrique

b - le collagène à l'Eosine ou Hématoxyline phosphomolybdique au dioxane

c - le cytoplasme au safran ou jaune d'acridine

(*) Hématoxyline phosphomolybdique au dioxane de J. André THOMAS (Bull. hist. Appl. 1943, 20, 48-49 et 212-214).

c) Méthodes spéciales pour l'étude du système nerveux.
Les imprégnations métalliques.

Parmi les nombreuses techniques d'imprégnations métalliques, beaucoup nous ont conduits à l'insuccès. Il avait déjà été signalé la difficulté d'obtenir de belles préparations du système nerveux des Mollusques par des imprégnations à l'argent (PAN 1958) (188), cependant, abondamment les méthodes de CAJAL, RIO HORTEGA, WILDER, décevantes sur notre matériel, nous avons sélectionné deux méthodes :

1 - La méthode de BIELSCHOWSKY, avec la modification de KERNOHAN, pour l'imprégnation de neurofibrilles (*). Cette méthode utilise pour l'imprégnation le liquide de BIELSCHOWSKY obtenu en redissolvant par l'ammoniaque de l'oxyde d'argent précipité par du nitrate de soude.

2 - La méthode de LAIDLAW au carbonate d'argent lithiné pour colorer la réticuline (**).

Avant toute imprégnation, les coupes étaient passées à la cellofodine et traitées par un oxydant (acide périodique) qui détruit l'affinité du cytoplasme et des noyaux pour l'argent.

d) Techniques d'Histochimie.

Mise en évidence des polysaccharides.

Nous avons utilisé le réactif de SCHIFF (P. A. S.) et le procédé de MAC MANUS (***).

Cette coloration caractérise les aldéhydes. L'acide périodique attaque les polysaccharides et les transforme en aldéhydes qui apparaissent en rose-violet lorsqu'ils sont en contact avec de la fuchsine décolorée par l'anhydride sulfureux.

(*) LANGERON (M.). Précis de microscopie 1949 - Masson Edit. Paris p. 668.

(**) MASSON. Diagnostic procedure and reagent - 1963. Harris COLMAN édit. N.Y.

(***) LISON (L.) Histochimie et cytochimie animales, principes et méthodes - 1960. GAUTHIERS VILLARS édit. Paris p. 740.

DEUXIEME PARTIE

Etude des explants en survie

CHAPITRE I.

ESSAIS EXPERIMENTAUX SUR LA SURVIE D'EXPLANTS

Le premier problème qui se posa à nous, pour la réalisation de notre travail, fut la désinfection des Planorbes entiers vivants.

A. - Essais expérimentaux de désinfection des Mollusques préalablement au prélèvement de l'explant.

Nos explants étant constitués par des organes externes de Planorbes (les tentacules), il nous a paru indispensable de procéder à une désinfection des Mollusques vivants, préalablement à la section de l'explant, afin d'apporter à notre milieu de survie des explants souillés au minimum, évitant ainsi une infestation microbienne massive de notre milieu dès le début de la mise en route de la survie.

Dans les premiers essais de survie d'explants, les auteurs tendent à obtenir la stérilisation de leur matériel de culture par divers procédés souvent peu efficaces, ou bien à action brutale, non sans dommages pour le maintien de l'intégrité des structures tissulaires. C'est ainsi qu'après le simple passage en eau de mer, puis en Ringer stérile, se révélant insuffisant, des solutions telles la teinture d'iode à 6 %, l'hypochlorite, le formol, le phénol etc. . . furent utilisées (BOHUSLAV, HILL) (20 - 21 - 127 - 128).

Un premier progrès sembla être fait par l'utilisation des rayons U. V. M. MURRAY en 1927 (177) (178) exposa ses explants de tissus de Planaires aux rayons ultra-violets. Ce procédé fut repris en 1929 par FISCHER-PIETTE (92) qui soumit ses explants de tissus de Crustacés à des U. V. pendant 25 à 40 minutes, mais cet auteur nota que si une telle exposition empêchait le développement des bactéries, elle nuisait également aux tissus des explants dont l'évolution était stoppée durant vingt quatre heures. BOHUSLAV en 1934 (20/21) observa également la détérioration des tissus d'*Helix* par les U. V.

Plus récemment, des auteurs travaillant en support solide (C. SENDEL 1963) (210) ont repris ce procédé réduisant les temps d'exposition aux rayons U. V. à 4 à 5 minutes.

Cependant, nous avons trouvé un double inconvénient à l'emploi des rayons U. V. D'une part, si l'exposition est de courte durée, l'asepsie obtenue est insuffisante, d'autre part, si on prolonge le temps d'action des rayons, les structures cellulaires de l'explant sont lésées.

Nous avons donc préféré, pour notre expérimentation, avoir recours à des antibactériens chimiques qui pourraient se révéler efficaces, sans dommage ultérieur pour les tissus. C'est pourquoi, nous avons également été amenés à abandonner un certain nombre de substances antiseptiques dont la toxicité avait déjà été démontrée, tels que le pentachlorophénol et corps voisins (BOHUSLAV 1934) (20-21), WEINBACH et NOLAN 1956 (255), ou l'iodure de potassium, le nitrate d'argent, le sulfate de cuivre, les dérivés de la quinoléine (J. A. THOMAS et BORDERIOUX 1948) (242), ainsi que certaines substances utilisées avec succès par différents expérimentateurs sur des organismes, sans doute plus résistants que les tissus de nos Planorbes, pour lesquels elles se sont révélées d'emblée toxiques : antiformine (Mc COY 1929) (164), mélange désinfectant complexe à base de chlorure mercurique (GLASER et STOLL 1938) (110).

Notre choix s'est donc porté sur une série d'antiseptiques à action douce ; nous avons essayé de maintenir des Planorbes entiers dans ces solutions antiseptiques, admettant que, si celles-ci ne se montraient pas toxiques pour ces derniers, elles seraient sans action nocive trop importante sur chacun de leurs organes ou tissus.

Techniquement trois Planorbes de taille moyenne (1 cm de diamètre) sont placés dans un petit becher avec 30 ml d'eau distillée stérile additionnée de l'antibactérien choisi. Ils y séjournent d'abord dix minutes pour le test de toxicité et ce temps est augmenté jusqu'à trois heures en cas de tolérance. Puis les Mollusques sont transportés dans un récipient contenant 30 ml d'eau distillée stérile fraîche. Au bout d'une heure de séjour en eau pure on vérifie leur vitalité.

De nombreux antibactériens testés ont pour effet de faire rentrer profondément les Mollusques dans leur coquille. Un laps de temps d'une heure est nécessaire pour la remise en extension et la reprise des mouvements.

Si celui-ci est plus long, on considère la substance antibactérienne comme impropre.

Nous résumerons brièvement les résultats obtenus avec chacune de ces substances.

Permanganate de K

Solution à 0,25 ‰. Les Mollusques remis en eau claire montrent une vitalité très réduite, leurs téguments sont encore attaqués.

Solution à 0,10 ‰. La vitalité des Planorbes n'est pas atteinte mais les téguments sont légèrement colorés en brun.

Solution à 0,05 ‰. Bonne vitalité. Les téguments ne semblent pas trop lésés, en particulier l'épithélium cilié des tentacules semble intact.

Solution d'hypochlorite.

Solution d'eau de javel à 1/100. Les Mollusques survivent assez difficilement.

Solution de chloramine T à 0,10 ‰

Après une immersion de dix minutes, les Planorbes sont encore vivants, mais après une remise en eau pure leur vitalité est très réduite, et la mort survient plus ou moins rapidement dans plus de 50 ‰ des cas.

Solution de dérivés d'ammonium quaternaire.

Nous nous sommes adressés au cétyl diméthyl hydroxy-2-cyclohexyle (biocidan).

Solution à 3 ‰. Les Planorbes sont vivants après une immersion de dix minutes, mais meurent après une remise en eau pure stérile dans un délai de quelques heures.

Solution à 2 ‰. Bonne survie après 15 minutes d'immersion, mais les individus de petite taille meurent dans les quinze minutes qui suivent la remise en eau claire.

Solution à 1 ‰. Bonne survie. Les individus restent vivants. Les téguments semblent intacts.

Solution de furadoïne.

La furadoïne est mise en solution saturée puis ensuite filtrée. On observe une bonne conservation de la vitalité - tous les individus supportent fort bien même une immersion prolongée (trois heures).

Solution de propionate de Na à 1 ‰

Les Planorbes supportent très bien l'immersion pendant une heure dans cette solution.

Ces résultats nous permettent de sélectionner une série d'antiseptiques quant à leur toxicité sur les Planorbes. Toutefois le problème avait un autre aspect, celui de l'action antimicrobienne ainsi obtenue. Celle-ci a été contrôlée parallèlement.

Lorsque les Mollusques semblent avoir bien supporté la désinfection, on prélève une goutte de l'eau contenue dans le becher de lavage et on ensemence une boîte de gélose. La densité des colonies apparues à la surface de la gélose, appréciée seulement à l'oeil, a permis de sérier les antibactériens ayant l'action la plus forte.

En outre, au critère d'action, il faut adjoindre l'examen de la conservation et la mobilité de l'épithélium cilié du tentacule.

Les résultats ainsi obtenus peuvent être consignés dans le tableau suivant :

	Survie	Aspects des téguments	Survie à longue échéance	Stérilité du milieu après 1 h.	Epithélium cilié
Mn O ₄ K					
0,50 ‰	-	-	-	+	-
0,25 ‰	-	-	-	+	-
0,10 ‰	+	-	-	+	-
0,05 ‰	+	+	+	+	+
Cl O Na					
1/10	-	-	-	+	-
1/100	+	-	-	+	-
Chloramine T					
0,10	-	-	-	+	-
Biocidan					
3 ‰	±	-	-	+	-
2 ‰	±	+	±	+	±
1 ‰	+	+	+	±	±
Furadone solution saturée et filtrée	++	++	++	+	++
Propionate de Na	+	+	+	±	+

Furadone = N (nitro 5 furfurylidène 2 amino hydantoine)

A la lecture de ce tableau il apparaît nettement que la solution de Furadone fournit les résultats les meilleurs.

C'est donc cette substance qui a été choisie pour la désinfection préalable des Planorbes entiers par une immersion de quinze minutes en solution saturée et filtrée.

B. - Etude du milieu de survie.

Le problème primordial pour la réalisation de nos survies d'explants fut l'établissement d'un milieu approprié.

Nous avons vu que les premières expérimentations sur les survies des tissus d'Invertébrés non marins, ont été faites dans des solutions salines utilisées pour les Vertébrés : Ringer dilué - Hedon Fleig - Locke-Tyrode.

Au moment de la réalisation de notre travail certains auteurs avaient déjà utilisé des solutions salines mieux adaptées aux besoins des tissus des Invertébrés.

Ainsi, en ce qui concerne la survie des tissus de Mollusques, FRASER en 1946 (99) suivit le développement embryonnaire du tractus génital des Limnées sur des oeufs séparés des pontes et des larves avant la fixation. Oeufs et larves étaient maintenus dans un milieu salin dont l'équilibre ionique se rapproche du milieu interne des Limnées. La même année et dans le même milieu CARRIKER étudia le fonctionnement du système alimentaire de *Lymnea stagnalis*, grâce à des explants provenant du vas déférent, prépuce terminal et prostate, qui survécurent soixante six heures dans cette solution.

Puis J. André THOMAS (239) proposa sa solution de survie équilibrée pour la culture organo-typique des petits organes d'Invertébrés dont il est possible de généraliser l'application à des espèces différentes, par quelques modifications.

En 1957 et 1959 deux auteurs américains CHERNIN (41) et MICHELSON (174) reprirent la solution saline de FRASER pour l'élevage de Planorbes dans des conditions d'asepsie. En 1958 VAGO (247) utilisa sa première solution pour culture de tissus de Gastéropodes et en 1961, RIPPLINGER (196) mit au point une solution basée sur la teneur en ions de l'hémolymphe d'*Helix*.

Enfin l'application très récente de la méthode de culture organo-typique de WOLFF et HAFEN (265), aux organes de Mollusques non-marins, est le plus souvent faite en milieux salins déjà expérimentés pour les Vertébrés. (cf. Tableau n° 4).

Nous discuterons ultérieurement de la valeur respective de ces solutions.

Cependant, aucune de celles-ci ne nous ayant paru répondre aux impératifs précis de notre expérimentation, nous avons entrepris de réaliser notre milieu de survie en partant des principes fondamentaux et bien définis de la méthode de J. André THOMAS.

Le principe du milieu de survie décrit par J. André THOMAS comprend trois phases :

- 1° - Une solution saline synthétique tamponnée,
- 2° - Des antiseptiques,
- 3° - Une solution nutritive adaptée aux besoins de l'explant.

1°/ La solution saline

La solution saline est fondamentale dans l'établissement d'un milieu de survie et certains principes généraux sont bien connus.

Ainsi RINGER montrait déjà toute l'importance des sels minéraux dans la conservation des cellules, c'est lui qui introduisit la notion de solution saline équilibrée.

Outre l'équilibre ionique, le maintien du pH dans certaines limites est indispensable, ainsi que l'avait compris LOKE lors de l'établissement de sa solution au contraire de la solution de Tyrode qui est très mal tamponnée.

Mais en plus de ces problèmes généraux, des problèmes précis et spéciaux se posaient à nous. Nous pouvons les résumer ainsi :

- Nécessité d'un milieu se rapprochant le plus possible du milieu interne des Australorbis.
- Nécessité de ne pas dépasser les taux toxiques déterminés pour les Planorbes vivants.
- Nécessité d'avoir un équilibre entre certains ions antagonistes.
- Nécessité d'avoir une solution tamponnée - choix d'un système tampon.
- Nécessité de stérilisation de cette solution - éviter les précipitations. Limite de pH compatible avec la survie.

a) Etude de la composition ionique.

En ce qui concerne le problème numéro un, la composition du milieu interne des Planorbes, les valeurs proportionnelles de chaque élément nous furent fournies par deux publications, celle de FLORKIN en 1943 (97), et celle de MAGALHAES et MORAES en 1957 (167) dont nous donnerons les chiffres respectifs dans le tableau, ci-après. Nous y avons ajouté pour comparaison les déterminations faites par CHERNIN en 1963 (44), (deux ans après la mise au point de notre milieu).

COMPOSITION DU MILIEU INTERNE DES PLANORBES

o0o

	FLORKIN 1943	MAGALHAES et MORAES 1957		CHERNIN 1963
Na	1,98	2,36 2,49 à		1,15
K	0,09	0,09 0,12 à		0,08
Ca	0,24	0,189		variable 0,34
Mg	0,027	0,028 0,044 à		0,044
Cl	0,7	1,84		1,31
P	0,007	P. inorganique 0,032		0,024
S	0,01	0,03		

D'autre part le résultat de l'analyse des cendres d'Australorbis, par la méthode spectrographique donne comme composant : sodium - potassium - calcium - phosphore - titane - chrome - cobalt - nickel - baryum - magnésium - aluminium - silicium - manganèse - fer - strontium - vanadium.

En outre, la limite des taux des différents ions compatibles avec la vie des Planorbes ont été déterminés par DESCHIENS (67) et sont les suivants :

Cl Na : 4 à 6 ‰ Cl K 2 ‰ $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 2 ‰ Cl Mg 4 ‰ SO Ca 3 ‰
(Sat) $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 2 ‰ SO_4Na_2 (2 ‰) CO_3Na_2 4 ‰.

Partant de ces données, nous avons donc cherché la correspondance en sels des taux déterminés par les auteurs en métaux et chlorures, sans dépasser les taux toxiques et en respectant la balance des ions, en nous adressant à des corps dont l'utilité dans les milieux de culture avait été démontrée.

Ainsi les ions Na seront fourni à la fois par Cl Na, PO_4HNa_2 CO_3HNa .

Les ions K seront fournis par Cl K et $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$.

Les ions Ca soit par le gluconate de Ca, soit par du Cl_2Ca . Nous nous sommes donc finalement arrêtés à la composition saline suivante, pour notre solution :

Cl Na	: 3,25 g	le système tampon :	
Cl K	: 0,25 g	$\text{PO}_4 \text{Na}_2$	0,10 g
$\text{SO}_4 \text{Mg}$	: 0,08 g	$\text{PO}_4 \text{H}_2\text{K}$	0,02 g
gluconate de Ca	: 2,40 g	bicarbonate de Na	: 0,20 g

Les cations démontrés comme les plus importants étant le sodium et le calcium, nous allons brièvement faire l'étude de ces ions dans notre solution et en étudier les rapports entre eux et avec les autres ions.

b) Etude des différents ions, rapport des ions

Nous avons pris pour base les chiffres fournis par FLORKIN, ceux des auteurs portugais nous paraissant, pour certains ions, incompatibles avec les limites de toxicité (ex. Na).

Etude de l'ion Na. Il nous paraît inutile de rappeler que le sodium est le cation vital par excellence, la solution appelée sérum physiologique n'étant qu'une solution de chlorure de sodium à 9 ‰.

Les travaux de FLORKIN donnent pour les Planorbes une quantité de Na de 1 g, 98 ‰ du milieu interne, qui exprimée, en ClNa correspond à 1,98 g ‰ de Na - $\frac{1,98 \times 58}{23} = 4,50$ g de Cl Na.

D'autre part, nous avons besoin 1) d'une quantité de Na apporté par $\text{PO}_4\text{H Na}_2$ qui sera un élément de notre système tampon, 0,10 g de PO_4Na_2 12 H_2O correspondant à 0,01 g de Na.

2) La nécessité de maintenir le pH neutre nous oblige à une addition de $\text{CO}_2\text{H Na}$ de 0,20 g, ce qui correspond à une quantité de Na de 0,06 g. Nous réduirons donc nos quantités de ClNa dans les mêmes proportions.

$$\frac{0,06 \times 58}{23} = 0,15 \text{ g.}$$

En utilisant 4,35 g de Cl Na dans notre solution de survie, nous équilibrons notre solution en Na dans les proportions correspondant exactement au milieu de FLORKIN. Mais nous avons été amenés à réduire ce taux à 3,25 g, car il nous a fallu tenir compte aussi de certains impératifs qui sont :

- le Δ° cryoscopique de notre solution finale : l'addition au milieu de glucose et de gluconate (facteurs nutritifs) nous oblige à réduire notre taux de Na en vue de maintenir un Δ de notre solution voisin du Δ interne des Planorbes. Ceci nous ramène aux taux utilisés par J. André THOMAS pour les Urodèles en milieu complexe où il utilise 3 g, 20.

- la vitalité des miracidiums dans une telle concentration de Cl Na , car la quantité de sels dissous dans la solution ne doit pas dépasser celle de la solution considérée par nous comme compatible avec la survie des miracidiums qui doivent vivre dans le milieu ambiant, lors de l'infestation de l'explant.

Nous avons signalé antérieurement (9), qu'outre la température, la proportion de sels dissous dans le milieu environnant les miracidiums, conditionnait la durée de vie de ceux-ci.

Ainsi dans de l'eau physiologique à 8,5 ‰, les miracidiums meurent instantanément.

Dans une solution à 5 ‰ les miracidiums tournent sur eux-mêmes et meurent en une heure.

4 ‰ vitalité diminué mort en 1 heure
 3,5 ‰ mobilité +++ après 1 heure
 3 ‰ mobilité +++ après 1 heure
 2 ‰ vitalité comparable à celle dans
 l'eau de fontaine.

Notre solution équilibrée à 3,25 g est donc dans la limite des taux de vitalité maxima.

Etude des ions Ca

Le rôle du calcium est primordial dans le maintien de la survie, et principalement dans la conservation des contractions musculaires. Dès 1898, HOWELL (129) conclut que la présence de calcium et d'une certaine quantité de potassium est indispensable à la persistance des contractions rythmiques du coeur veineux de Tortue.

Ensuite, en 1905 HEDON et FLEIG (125) démontrent le rôle de l'adjonction d'un sel de calcium dans le maintien ou la réapparition des contractions d'intestin grêle isolé du Lapin.

BENEDENICT en 1908 (8) confirme le rôle favorable du calcium sur les contractions de fragments de ventricules de Tortue.

En 1909, FLEIG (96) dans son travail sur la survie et la reviviscence de spermatozoïdes dans quelques milieux artificiels, constate que les spermatozoïdes sont beaucoup plus mobiles lorsque le milieu externe contient des petites quantités de CaCl_2 (0,02 à 0,05 g %) et qu'une adjonction de calcium au milieu de survie suffit à faire reprendre les mouvements interrompus. Et c'est ainsi qu'il écrit : vu les notions déjà connues sur l'action du calcium dans la production du mouvement, il semble donc que cet élément soit nécessaire à la réalisation de tout phénomène moteur même élémentaire".

Depuis lors, les travaux de A. JULIEN (138-139), Léon BINET (16) et leurs collaborateurs (1954-1955) ont montré que l'enrichissement du milieu en calcium (jusqu'à un certain taux) augmente la durée de survie du ventricule d'*Helix pomatia*, en place dans le coeur entier.

Enfin VALETTE, COHEN et leurs collaborateurs (246) ont montré en 1957 que lorsque le liquide de survie est privé de calcium, les contractions histaminiques de l'iléon et de l'utérus de Cobaye sont inhibées.

Nous avons donc jugé utile de maintenir un milieu riche en calcium, notre explant étant doué de mouvements de contractions.

Pour ce faire, nous avons le choix entre le chlorure et le gluconate de Calcium. Notre choix s'est porté sur le gluconate, et nous avons complètement éliminé le chlorure, car nous avons déjà une grande quantité d'ions Cl^- fournis par le ClNa et par le ClK , et un excès de chlore serait toxique pour nos explants.

La quantité 2,40 g a été déterminée par la composition du milieu interne des Planorbes. Nous avons donc maintenu la quantité de Ca en diminuant la quantité corrélative de Na.

Etude des rapports des ions.

Nous avons ensuite étudié le rapport entre les divers ions, la conservation des contractions et des mouvements ciliaires de nos explants dépendant d'un bon équilibre ionique.

Le travail de FLORKIN nous donne les rapports suivants :

$$\begin{aligned} \text{Rapports} = \frac{\text{Na}}{\text{K}} &= \frac{1,98}{0,09} = 22 \\ \frac{\text{Ca}}{\text{Na}} &= \frac{0,24}{1,98} = 0,12 \end{aligned}$$

Dans notre milieu, Na nous est fourni par :

$$\begin{array}{ll} \text{ClNa} & 3,35 \\ \text{CO}_3\text{H Na} & 0,20 \\ \text{PO}_4\text{H Na}_2 & 0,10 \end{array} \left\{ \begin{array}{l} \text{ce qui correspond à un chiffre} \\ \text{de 1,35 pour Na total} \end{array} \right.$$

et K par :

Cl K 0,25 ce qui correspond à 0,14 pour la totalité K.

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,02

et nous donne les rapports :

$$\frac{\text{Na}}{\text{K}} = \frac{1,35}{0,14} \quad \#10$$

et
$$\frac{\text{Ca}}{\text{Na}} = \frac{0,24}{1,35} = 0,17$$

La diminution du taux de ClNa est rendue nécessaire par l'étude faite au paragraphe précédent, et par la nécessité d'obtenir une bonne survie des miracidiums dans la solution.

Le rapport $\frac{\text{Na}}{\text{K}} = 10$ nous paraît plus favorable à la bonne conservation des mouvements ciliaires et un rapport $\frac{\text{Ca}}{\text{Na}}$ plus élevé compatible avec le maintien des contractions musculaires. Un excès relatif de Ca étant signalé par tous les auteurs comme un élément favorable.

D'autre part, avec les chiffres que nous avons retenus, si nous étudions le rapport $\frac{\text{Ca}}{\text{K}}$, en se référant aux chiffres de FLORKIN, on obtient :

$$\frac{0,24}{0,09} = 2,6$$

et dans notre milieu nous avons :

$$\frac{0,24}{0,14} = 1,7$$

Au rapport très élevé de FLORKIN, nous avons préféré nous rapprocher le plus possible du rapport 1,5 préconisé par J. André THOMAS, dans son travail sur la survie des Urocèles (241) (242).

Lors de notre survie nous avons le désir de surveiller la vitalité d'un épithélium cilié d'où une nécessité d'apport de K impor-

tant, dont on connaît l'action bénéfique sur l'épithélium ; et d'autre part, les contractions musculaires nous faisaient l'obligation d'un apport calcique important, que nous avons cependant essayé de maintenir au niveau de l'analyse élémentaire des divers ions.

$$\begin{array}{rcl} \text{Le rapport : } \frac{\text{Na}}{\text{Mg}} & \text{chez FLORKIN} & \frac{1,98}{0,027} = 73 \\ & \text{dans notre milieu} & \frac{1,35}{0,008} = 160 \end{array}$$

Notre milieu paraît pauvre en Mg, mais pour en augmenter la teneur nous aurions dû y apporter du Cl_2Mg , ce que nous avons voulu éviter ayant déjà un excès de Cl^- . D'autre part, la pauvreté de notre milieu en anions et notre désir de maintenir SO_4 à la dose de 0,01, nous ont amené à réduire le taux de Mg qui ne représente que 10 % de la quantité de $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Le manque de Mg est compensé dans notre milieu par un apport supplémentaire de K comme nous l'avons déjà signalé.

Etude de l'ion Cl^- .

Ainsi que nous venons de le remarquer, notre milieu comporte un grand excès de Cl^- par rapport à l'étude de FLORKIN, nous avons en effet :

$$\text{ion } \text{Cl}^- \text{ apporté par } \text{ClNa} : \frac{3,25 \times 35}{55} = 1,9$$

$$\text{ion } \text{Cl}^- \text{ apporté par } \text{ClK} : \frac{0,25 \times 23}{69} = 0,08$$

Total : 1,98

et d'après FLORKIN : 0,7

Mais l'analyse de FLORKIN est très déficitaire en anions, le sodium semble, peut-être, lié à des carbonates (DUVAL) (81).

Toutefois nos chiffres se rapprochent assez des rapports trouvés par MAGALHAES et MORAES car :

$$\begin{array}{rcl} \text{d'après FLORKIN} & \frac{\text{Cl}^-}{\text{Na}} = \frac{1,98}{0,7} & = 2,8 \\ \text{d'après MAGALHAES et MORAES} & \frac{\text{Cl}^-}{\text{Na}} = \frac{2,40}{1,84} & = 1,3 \end{array}$$

dans notre solution $\frac{\text{Cl}^-}{\text{Na}} = \frac{1,98}{1,35} = 1,39$

Nous sommes donc bien restés dans les normes ressortant de ces analyses.

Rapport : $\frac{\text{Na}}{\text{Ca}}$ chez FLORKIN $\frac{1,98}{0,24} = 8$

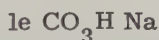
notre solution $\frac{1,35}{0,24} = 5,5$

Notre solution nécessite un apport de Ca suffisant pour alimenter les contractions qui sont meilleures lors d'un taux de Ca supérieur.

En conclusion, notre solution paraît pauvre en Na et Mg, mais bien équilibrée pour les autres ions, avec une concentration en calcium assez élevée. Nous verrons que, malgré cela, sa balance ionique est comparable à celle du milieu interne des Planorbes (voir étude du Δ°).

c) Etude du système tampon.

Celui-ci se décompose en deux éléments :



Le pH final de la solution, s'il est légèrement alcalin, ne pose aucun problème, par contre, en pH acide, on assiste à une diminution rapide de la vitalité de l'explant.

- Choix de $\text{CO}_3\text{H Na}$. Pour tamponner l'acidité de notre milieu et nous mettre d'autre part en solution légèrement alcaline pH = 7,1 - 7,2 optimum pour les tissus des Planorbes, nous avons été amenés à additionner notre milieu de $\text{CO}_3\text{H Na}$. Un travail de DUVAL en 1928 (81) signale en effet que 46 à 59 % de la concentration ionique du sang des Planorbes est attribuable aux carbonates. Même si le $\text{CO}_3\text{H Na}$ se décompose spontanément à l'air avec libération de CO_2 et formation de CO_3Na_2 , ce n'est pas un inconvénient dans notre cas, car cela donne une légère alcalinité au milieu, nécessaire au Planorbe. D'autre part le rôle bénéfique du bicarbonate sur les contractions a été signalé.

- Choix de la quantité de Phosphates. Le milieu de J. André THOMAS comporte de grandes quantités de phosphates mais nous avons été amenés à les réduire, car le milieu interne des Planorbes ne contient que 0,007 mg % de P, et avec 0,12 g de phosphate nous avons déjà une quantité de P de 0,0105 g. Nous avons cependant maintenu ce taux car certains auteurs ont prétendu que les phosphates stimulaient la croissance de l'épithélium.

d) Etude de l'évolution du pH de la solution saline.

Nous avons été amenés à étudier le maintien du pH de notre solution dans des limites compatibles avec les expériences en cours. Celui-ci aurait tendance à s'alcaliniser par légère décomposition du bicarbonate. Ces modifications spontanées sont intéressantes pour la connaissance de la durée de validité de notre préparation.

1) Solution mère :

pH électrométrique

jours	1	2	3	6	7	8	10	14	18	21	28
	6,96	6,93	7,11	7,03	6,95	7,01	7,03	7,01	7,00	7,05	7,02

2) Solution diluée :

	1	2	3	7	10	14	18	21	28
	6,85	6,97	6,71	6,56	6,95	6,83	7,00	7,00	7,00

3) Solution diluée complète avec bicarbonate et gluconate :

	1	2	3	4	7	10	14	18	21	28
	7,07	7,25	7,31	7,41	7,48	7,50	7,55	7,58	7,55	7,57

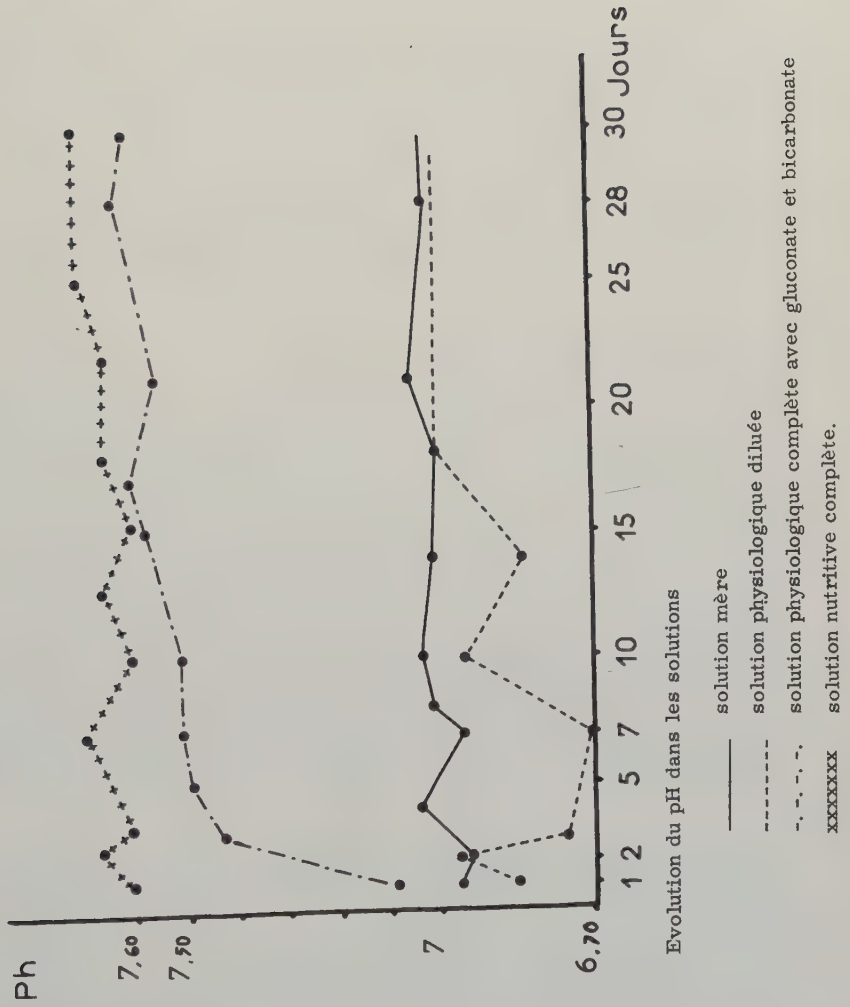
Notre solution marque une stabilité certaine bien qu'une légère tendance à l'alcalinisation se manifeste assez précocément, mais grâce à son tampon aux phosphates, elle se maintient stable dans des limites suffisantes. Les courbes ci-contre illustrent ces variations.

Nous pouvons envisager une conservation assez longue, toutefois nous préférons refaire cette solution toutes les semaines.

Le pH de la solution saline mère étant très stable, cette solution stock pourra se conserver très longtemps. La variation n'étant que de 6,96 à 7,02 pendant 28 jours.

2°/ La solution nutritive.

Les solutions physiologiques, même les plus complexes, n'entretiennent la survie que pendant un temps extrêmement court. Elles ont pour triple rôle de maintenir la pression osmotique dans des li-



mites convenables, d'apporter le système tampon qui maintient le pH à des taux physiologiques, et de fournir l'eau et les ions inorganiques essentiels. L'apport d'éléments nutritifs est indispensable au prolongement de la survie.

Nous avons donc été amenés à déterminer quelles substances nutritives entreraient dans la composition de notre milieu de survie.

a) Le glucose

Le premier élément nutritif préconisé a été le glucose ; une des plus anciennes solutions de survie, celle de Tyrode, en contient 100 mg pour 100 ml d'eau. Cependant l'importance réelle du glucose dans le milieu nutritif est encore à l'heure actuelle controversée.

D'après les études de FISCHER (90) certains oses tels que le fructose et le mannose pourraient remplacer le glucose, mais d'autres, tels que : saccharose, lactose, xylose etc. . . seraient sans effet.

D'autre part, d'une épreuve d'utilisation des glucides faite par l'Ecole de WOLFF en 1954 (263), il ressort que seul le mannose parmi les glucides pourrait se substituer qualitativement et quantitativement au glucose ; parmi les autres sucres testés : hexoses (galactose ou fructose) ou pentoses (xylose, d ribose) ou diholoside (saccharose) aucun n'est favorable indifféremment à tous les tissus. Quelques uns peuvent être acceptés spécifiquement par certains organes en survie (galactose pour les gonades), mais ne sont absolument pas utilisés par d'autres. Les auteurs concluent, en outre, que les organes qu'ils ont pris comme test, (gonades - syrinx - tibia) ne peuvent se passer d'un glucide. Seule la peau pourrait admettre le remplacement du glucose par la cystéine (SENGEL 1955) (in 263). A l'heure actuelle certains auteurs tendent à penser que divers acides aminés pourraient se substituer aux oses comme source d'énergie et d'après des travaux récents, le glucose pourrait être remplacé dans les cultures de tissus par le pyruvate ou l'alanine qui peut facilement se transformer en pyruvate.

Cependant il s'avère expérimentalement que, malgré tout, dans un milieu dépourvu de glucose les tissus dégénèrent et meurent rapidement.

Il est à remarquer d'autre part, que les cultures organo-typiques réalisées avec succès chez les Mollusques l'ont été dans des milieux de survie contenant du glucose. Ainsi, outre la solution de Tyrode déjà nommée (utilisée par l'Ecole de WOLFF), les solutions proposées par BOHUSLAV (20/21) pour les tissus d'Helix pomatia contiennent 2 g de glucose p. 1.000, celle de VAGO et CHASTANG (248) pour les mêmes Mollusques en contient 1 g ‰, de même que

celle utilisée par CHERNIN (44) travaillant sur des tissus d'A. glabratus après la publication de la composition de notre milieu; et GOMOT et GUYARD (112) (118) travaillant en 1963 sur la glande hermaphrodite d'Helix utilisent une solution contenant 0,5 g glucose p. 1.000.

Le glucose nous a donc paru la meilleure source d'énergie pour des tissus en culture.

C'est pourquoi, après des essais de diverses concentrations, la concentration glucosique nécessaire et suffisante pour la survie de nos tentacules fut arrêtée à 1 g p. 1000.

b) Les acides aminés.

Après l'étude de l'action nutritive du glucose, de très nombreux travaux furent poursuivis sur l'utilité des principes actifs contenus dans les constituants de la matière vivante. Il en ressort que, ceux qui ont une action primordiale sur la conservation de la vie "in vitro" sont par ordre décroissant : les acides aminés et les peptides, les acides nucléiques et leurs produits de clivage, les lipides.

Les acides aminés fondamentaux sont considérés comme les constituants indispensables des milieux nutritifs depuis SMYTH en 1914 qui le premier réalise un milieu avec de la gélose et de la peptone.

De nombreuses expériences ont ensuite prouvé l'utilité des acides aminés, mais leur choix et leurs proportions sont encore fonction des expérimentateurs et de l'objet biologique considéré. Certains peuvent être bénéfiques, d'autres nuisibles, et même leur action propre peut varier selon la quantité utilisée.

On ignore donc encore quels acides aminés sont indispensables et lesquels sont simplement favorables. Cependant, parmi les acides aminés, les plus importants paraissent être ceux dont la molécule présente un groupement sulfhydryle : cystéine, méthionine ou glutathion.

J. A. THOMAS et BORDERIOUX (242) dans leur milieu de culture organo-typique, utilisent une solution nutritive contenant les acides aminés suivants : glycine, tryptophane, cystéine, auxquels ils adjoignent du gluconate de Ca, de l'acide ascorbique et les deux acides nucléiques.

Pour les tissus de Mollusques pulmonés VAGO et CHASTANG (248), utilisent un hydrolysate de caséine, de la glutamine, de la choline, plus un extrait de levure.

ACTION COMPAREE DE LA LACTALBUMINE ET DE L'HYDROLYSAT
DE CASEINE SUR LA SURVIE DES EXPLANTS.

	Concentration 0/00 →	0,25	0,30	0,40	0,50	0,60	0,70	0,80	0,90	1,00
		Durée de la survie en jours ↓								
Lactalbumine	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0
	2	+++	+++	+++	+++	++	++	++	0	0
	5	+	+	++	++	+	+	+	0	0
	8	0	0	+	++	+	+	0	0	0
	10	0	0	+	+	+	0	0	0	0
Hydrolysat de Caséine	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+
	2	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	0
	5	+	+	++	+++	++	+	+	0	0
	8	0	+	+	+++	++	+	0	0	0
	10	0	0	+	+++	+	+	0	0	0

Tableau n° 1.

CHERNIN (44) dans son travail publié en 1963, après la mise au point de notre milieu de survie, utilise un hydrolysât de caséine plus un extrait de levure, auquel il ajoute du liquide amniotique de Boeuf, de l'extrait embryonnaire de Poulet et du sérum de Cheval.

De même GOMOT et GUYARD en 1963 (112-118) ont utilisé le liquide de GEY avec adjonction d'hémolymphe d'Helix, donc un milieu sans acides aminés additionnels.

L'analyse du contenu en acides aminés de l'hémolymphe et des tissus d'A. glabratus par CHERNIN (44) a été effectuée en 1963, c'est-à-dire deux ans après la mise au point de notre milieu de survie. Cependant ce travail qui démontre la présence de dix sept acides aminés, ne détermine pas leur valeur respective.

Avec les données que nous possédions au début de notre expérimentation, nous avons tenté d'enrichir notre milieu en éléments nutritifs grâce à des mélanges d'acides aminés. Nous avons utilisé l'hydrolysât de caséine ou la lactalbumine.

En effet, la caséine est une phosphoprotéine qui fournit par hydrolyse les acides aminés suivants :

- glycocolle, alanine, valine, leucine, proline
- phénylalanine, tyrosine, acide aspartique, acide glutamique, arginine, lysine, histidine, tryptophane et méthionine.

La lactalbumine est voisine de la sérumalbumine, mais en diffère par sa teneur élevée en lysine (12, 2 %) et en tryptophane (12, 9 %).

Ces deux substances nous ont paru propres à apporter à nos explants les acides aminés indispensables à la prolongation de leur survie.

Toutes deux furent testées à des taux de 0, 25 à 1 g ‰. Le tableau n° 1 résume les résultats obtenus.

Les meilleures survies par la durée et l'activité de l'explant furent obtenues avec un hydrolysât de caséine, fourni par l'Institut Pasteur de Garches, utilisé dans les proportions de 0, 50 g ‰.

Outre cet hydrolysât de caséine, source des acides aminés essentiels, nous avons été amenés à additionner notre milieu d'un complexe sulfhydrylé : la cystéine, et à l'enrichir de glycocolle, notre matériel explanté étant éminemment contractile.

D'autre part un apport vitaminique nous a paru indispensable.

c) Les vitamines.

Nous avons donc ajouté à ces facteurs nutritifs 0,02 g % d'acide ascorbique dont la nécessité est reconnue par de nombreux auteurs. Cette vitamine contribuerait à maintenir en bon état les lames épithéliales, favorisant les échanges entre les cellules et le milieu.

De plus, il a été noté, que les sérums provenant d'animaux scorbutiques exerçaient un effet souvent nocif sur les cultures de tissus.

Outre l'acide ascorbique, le groupe des vitamines B est apporté dans notre milieu par de l'extrait de levure. En plus de la nécessité de la vitamine B¹, l'action de certaines des vitamines du groupe B (biotine et acide folique) semble être considérable sur certaines cultures. Le temps de survie de fibroblastes embryonnaires de Poulet en culture, en gouttes pendantes, peut être doublé en présence de ces deux vitamines. L'action favorisante de l'acide folique a été confirmée par les travaux de l'école de WOLFF (263).

d) Les liquides biologiques naturels.

De nombreux travaux ont montré que les constituants des liquides biologiques : plasma, sérum sanguin, liquide d'exsudats, humeur aqueuse ou sang total étaient nécessaires au bon maintien de la survie. La durée de celle-ci est nettement plus longue lorsque le milieu nutritif en contient une certaine quantité.

Les constituants du plasma, sérum ou sang total, jouant un rôle primordial, n'ont pu encore être délimités avec certitude : leurs modes d'action n'ont pu encore être parfaitement élucidés, l'expérience seule, ici, guide la mise au point du milieu nutritif optimum.

L'opportunité d'enrichir le milieu nutritif pour Mollusques par adjonction de sang homologue, avait déjà été discutée dans les années 1934, par les premiers auteurs entretenant des cultures de tissus d'*Helix*. Toutefois, il ne faut pas oublier que ces auteurs travaillaient en absence d'antibactériens.

BOHUSLAV (20/21) prétend que le sang contient des substances toxiques le rendant impropre à servir dans les milieux de culture ; des passages successifs dans du sang rendent les amœbocystes plus minces et incapables de former un réseau cellulaire.

GATENBY (103 à 108) au contraire estime que le sang apporte des anticorps qui agissent contre les bactéries. Ceci excepté, les milieux des deux auteurs sont très proches l'un de l'autre, sauf en ce qui concerne les quantités de glucose (0,06 % et 1 %).

e) Les extraits tissulaires.

Outre les liquides biologiques, de nombreux expérimentateurs depuis CARREL en 1913, ajoutent à leurs milieux nutritifs des extraits tissulaires.

Désireux, pour notre part, d'enrichir notre milieu de survie en extraits spécifiques, nous avons effectué des séries d'essais préliminaires avec, soit des extraits totaux, soit des extraits musculaires, soit du sang, soit du liquide de la cavité interne, soit de ces divers éléments mélangés. Le tableau n° 2 résume les résultats obtenus sur 5 jours de survie.

Les extraits totaux de Planorbes entraînent la mort presque immédiate de l'explant, les extraits musculaires au contraire donnent des résultats satisfaisants. Nous en avons conclu à la présence de substances toxiques dans les tissus internes : intestin, hétopancréas ou glande hermaphrodite.

L'adjonction de sang total et de liquide de la cavité interne nous donnait de bons résultats, mais les quantités que l'on peut extraire sont très limitées. Nous avons donc utilisé un mélange d'extraits musculaires + sang total + liquide de cavité interne.

La préparation d'un tel extrait se fait de la façon suivante :

Des Planorbes entiers de grande taille sont trempés rapidement dans une solution de colimycine concentrée (200 g par ml), puis rincés à l'eau stérile et plongés à nouveau pendant dix minutes dans une solution de Furadoïne saturée et filtrée. Après rinçage en eau stérile, le Mollusque est transféré dans une boîte de Pétri stérile, une fenêtre est pratiquée dans la coquille par laquelle on ponctionne le sang du coeur et le liquide de la cavité interne.

La ponction du coeur est faite à l'aide d'une pipette Pasteur pas trop effilée et rodée, munie d'un tuyau de caoutchouc avec embout buccal. Le sang et le liquide de la cavité interne sont recueillis dans un tube stérile et conservés à la glacière jusqu'au moment où ils seront incorporés à l'extrait musculaire total. La coquille du Mollusque est alors brisée et entièrement retirée. On sépare tout ce qui n'est pas musculaire, hétopancréas, intestin, tractus digestif, glande hermaphrodite etc. . . pour ne conserver que la musculature. De tels fragments musculaires de plusieurs Planorbes sont réunis et broyés sous congélation dans un mortier stérile.

Le broyat est centrifugé et le liquide surnageant est repris avec une quantité égale de solution saline stérile. On incorpore alors le sang et le liquide de la cavité interne recueillis précédemment. Ceci constitue l'extrait musculaire total.

Toutes ces opérations sont pratiquées sous U. V. dans une boîte à manipulations à atmosphère stérile.

Si une contamination est cependant supposée, l'extract est passé sur bougie. Après essais comparatifs avec des concentrations allant de 1 à 20 %, le taux optimum déterminé fut 10 % de la concentration du milieu final.

f) Facteurs de croissance.

Outre ces facteurs, diverses substances réputées favorables dans les milieux nutritifs ont été testées sans succès, quant à leur action sur la survie. Ce furent principalement l'A. T. P. et la carnithine.

L'A. T. P. a été utilisé sous forme de sel disodique à des concentrations allant de 1/100.000 à 1.1000 et n'apporta que des résultats peu encourageants créant une dédifférenciation plus rapide. (cf tableau n° 2).

- La carnithine (acide chlorométhyl γ diméthyl amino β hydroxybasynique) a été essayée à des taux allant de 10 à 45 % du liquide nutritif total. Là non plus, les résultats n'ont pas été satisfaisants, les phénomènes de dédifférenciation sont accélérés. (cf Tableau n° 2).

Nous nous sommes donc contentés, dans notre milieu nutritif, de glucose, d'hydrolysate de caséine, de cystéine, de glyco-colle, d'extract de levure, d'acide ascorbique et d'extract musculaire total de Planorbes.

3°/ Les antiseptiques.

Choix des antibiotiques.

Il nous a paru nécessaire d'adjoindre à notre solution de survie ainsi définie, un certain taux d'antibactériens, bien que la méthode de J. André THOMAS ne nécessite pas une stérilité bactérienne absolue. Nous avons donc été amenés à rechercher l'obtention de la stérilité la plus poussée de façon à réduire le plus possible les proliférations microbiennes ou mycosiques, qui finissent par entraver la survie des explants.

Comme nous l'avons vu (cf. historique), il faut attendre la découverte des sulfamides pour que les expérimentateurs disposent de substances antibactériennes utilisables dans les milieux de survie.

J. André THOMAS introduisit dès 1941 (231 et suivants) des corps bactériostatiques dans ses expériences de cultures organotypiques. Cet auteur, à l'époque, utilisa avec succès, certains dérivés sulfamidés principalement la p. amino-phényl sulfamide, l'élcosine = 6 sulfamilamido 2-4 diméthyl pyrimidine et la pénicilline.

ACTION DES DIVERS FACTEURS NUTRITIFS
VITALITE DE L'EXPLANT APRES CINQ JOURS DE SURVIE

55 bis

Concentration % →	1	5	10	20	25	30	40
Adjuvants ↓							
Extraits totaux de Planorbes	+	0	0	0	0	0	0
Extraits musculaires seuls	+	++	+++	++	+	0	0
Sang	+	+	+++	++	+	+	0
Liquide de la cavité interne	0	+	++	+	+	+	0
Sang + liquide de la cavité interne	+	+	+++	++	+	+	0
Carnithine	0	0	0	0	0	0	0
A. T. P.	1/1.000	1/10.000	1/20.000	1/50.000	1/100.000		
	0	0	0	0	0		

Tableau n° 2.

En 1948 WILDE (258) utilisa les sulfamides et la streptomycine pour ses études sur l'organogenèse "in vitro" des tissus embryonnaires de l'Amblyostome.

Mais la découverte de nombreuses substances antisulfamides, tels l'hydrolysate de levure, ou les acides aminés (WOODS et FILDES) (267), ainsi que l'action souvent nocive des sulfamides elles-mêmes sur les tissus, (réduction des échanges respiratoires), ont limité l'utilisation de ces corps dans les expérimentations sur la survie. [BARNES 1940 (7) sur la peau de Grenouille, THOMAS (233 à 238) sur oeufs d'Oursin (1941 et suivantes), LWOFF et coll. (163) sur flagelles 1941, MELLON et Mac KINNEY (172), JOCOBY et coll. (133), RODANICHE (198)] .

Depuis lors, on connaît la vogue de l'utilisation des différents antibiotiques en cultures de tissus au fur et à mesure de leur découverte. L'expérimentation de certains d'entre eux, est encore en cours actuellement. Les plus couramment employés dans les cultures de tissus routinières, sont la Pénicilline, la Streptomycine et un antimycosique : la Mycostatine.

Cependant certains sulfamides ont fait preuve d'une action favorable dans des expérimentations récentes. Ainsi l'adiazine et la gantrisine dans les survies d'*Ascaris* entreprises par CAVIER et SAVEL en 1952 (38).

C'est pourquoi nous avons expérimenté, outre les antibiotiques classiques, différentes substances sulfamidées pour l'obtention de l'asepsie de nos explants en survie.

Dès l'abord, les tissus d'*Australorbis glabratus* se sont montrés particulièrement sensibles à certaines substances antibiotiques couramment employées dans la préparation des milieux de culture de tissus.

Une première expérimentation fut effectuée sur les Planorbes, vivants. Reprenant les travaux de SENECA et BERGANDAHN (206) en 1955 qui étudient quatorze substances antibiotiques, on peut reconstituer le tableau suivant :

Antibiotiques	Dose utilisée	Survie des Planorbes
Thiolutine	0,25 $\mu\text{g/ml}$	12 heures
	0,06 "	24 "
	0,003 "	1 semaine
Rimocycline	3,9 "	24 heures
Anisomycine	6,25 "	48 "
Mycostatine	15,6 "	1 "

Polymixine	625 µg/ml	1 jours
	312 "	2 jours
	39 "	1 semaine
Néomycine	1.000 "	2 jours
	250 "	1 semaine
Tétracycline	1.250 "	1 heure
	625 "	2 jours
	156 "	1 semaine
Carbomycine	5.000 "	1 heure
	2.500 "	1 semaine
Bacitracine	1.000 "	pas d'effet en 1 semaine
Erythromycine	5.000 "	1 semaine
Viomycine	10.000 "	1 semaine
Streptomycine	10.000 "	2 jours
	5.000 "	1 semaine
Pénicilline	10.000 "	1 semaine

Sous le double aspect du maintien de la stérilité relative du milieu et de la tolérance des Mollusques aux antibiotiques, nous avons procédé à de nombreux essais, résumés dans les tableaux suivants :

<u>Antibiotiques</u>	<u>Doses par ml</u>	<u>Survie</u>	<u>Résultats</u>
Pénicilline	200 U. O.	+	0
	500 U. O.	+	0
Streptomycine	100 µg	0	0
	50 "	0	0
Chloromycétine	5 "	+	0
Tétracycline	150 "	+	+
Terramycine	5 "	+	+
Colimycine	50 "	+	++
Bacitracine	1.000 U	0	+
	100 "	±	+
Mycostatine	10 µg	0	+
Sulfamides			
Sultirène	100 "	±	+
Thiazomide	100 "	±	±
Rufol	100 "	0	±
Adiazine	100 "	0	±
Furadofne	100 "	++	+

Nous avons pu ainsi vérifier la très grande toxicité de la streptomycine (CHERNIN 1957-1959) (42-43-46) et de la mycostatine envers nos explants qui moururent en quelques heures après immersion dans le milieu additionné de ces antibiotiques (nous rappellerons que la mycostatine est soluble uniquement dans l'alcool).

Cette première approximation nous ayant permis d'éliminer un certain nombre d'antibiotiques toxiques, nous avons opéré une nouvelle sélection en cherchant parmi les divers antibiotiques ceux dont l'action sur les colonies microbiennes était la meilleure.

Nous avons ainsi testé les antibiotiques, par la méthode des disques de l'Institut Pasteur (CHABBERT 1955) (39), suivant leur action sur une culture réalisée à partir des germes isolés de nos milieux de survie.

Une goutte du milieu dans lequel la survie de l'explant s'est poursuivie est ensemencée à la surface d'une boîte de Petri contenant la gélose spéciale pour ce test. On dispose alors, sur cette gélose des disques de papier préalablement imbibés avec des solutions des divers antibiotiques, et séchés. Après vingt quatre heures de culture, chaque disque imprégné d'un antibiotique efficace, est entouré d'une zone circulaire où les germes n'ont pas poussé. Le diamètre de cette zone d'inhibition permet d'apprécier l'action de l'antibiotique considéré.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

	Activité
Tétracycline	+++
Terramycine	+++
Chloramphénicol	+++
Polymyxine	++
Néomycine	++
Colimycine	++
Framycétine	++
Auréomycine	+
Streptomycine	+ (culture 2°)
Pénicilline	0
Novobiocine	±
Erythromycine	+
Carbomycine (Magnamycine)	0
Spiramycine (Rovamycine)	0
Oleandomycine	±
Bacitracine	+++
Kanamycine	+

Cette même expérience fut répétée au stade des sulfamides avec :

Sulfaméthoxypyridazine (sultirène)	7. 522 R. P.
P. amino phényl sulfamide thiazol (thiazomide)	2. 090 R. P.
P. amino phényl sulfamido méthyl diodiazole (Rufol)	
P. amino phényl sulfamido pyrimidine (adiazine)	2. 616 R. P.

Sans obtenir de résultats réellement concluants.

Finalement les activités sélectionnées par groupe nous ont donné :

Tétracycline - Colimycine - Bacitracine

Des solutions de ces trois antibiotiques pures ou mixtes furent expérimentées pour la survie d'un tentacule maintenu dans 5 ml de solution saline équilibrée. Des doses de 25 à 100 $\mu\text{g/ml}$ furent ainsi essayées, en notant quotidiennement les modalités de la survie, la vitalité de l'explant, l'importance des proliférations microbiennes. Les résultats furent consignés dix jours de suite, et résumés dans le tableau n° 3.

En conclusion : C'est le mélange colimycine, tétracycline dans des proportions 2/1, qui se révèle à action optimale.

Des essais de ce mélange sur une mise en survie d'explant donne les résultats suivants, comparés à ceux des solutions d'antibiotiques pures :

	Survie	Mobilité	Développement flore microbienne
Tétracycline 100 $\mu\text{g/ml}$	+	$\pm$	0
Colimycine 100 $\mu\text{g/ml}$	+	+	$\pm$
Colimycine/tétracycline 80 $\mu\text{g/ml}$ 50 $\mu\text{g/ml}$	+	+	0

C'est pourquoi finalement un mélange de colimycine et de tétracycline à des doses de 80 $\mu\text{g/ml}$ et 50 $\mu\text{g/ml}$ est retenu comme antibactérien dans la solution de survie.

4° - Etude du Δ° cryoscopique de la solution de survie.

Le Δ° cryoscopique du milieu a une importance considérable dans le maintien de la survie.

C'est ainsi que ZWEIBAUM en 1925 (273) à propos de ses expériences sur l'épithélium vibratile des branchies d'Anodonte écrit : "En augmentant ou en diminuant la pression osmotique du milieu on abrège d'une façon très régulière la vie de l'épithélium". Et les durées de survie qu'il obtient sont au maximum et en moyenne de :

16 et 20 jours pour un	$\Delta^\circ = - 0,05$
38 et 35 jours pour un	$\Delta^\circ = - 0,07$
7 et 5 jours pour un	$\Delta^\circ = - 0,018$
63 jours pour un	$\Delta^\circ = - 0,15$ (concentration optima)
25 et 23 jours pour un	$\Delta^\circ = - 0,30$
15 et 13 jours pour un	$\Delta^\circ = - 0,38.$

Jours de survie $\longrightarrow$ $\mu\text{g/ml}$	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10	
	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M
Bacitracine $\longrightarrow$ 25 50 100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	$\pm$	+	$\pm$	+	$\pm$	+	$\pm$	+	$\pm$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	$\pm$	+	$\pm$	+	$\pm$	+	$\pm$	+	$\pm$	+	+	+	+	+	+	+	+	$\pm$	$\pm$
Colimycine 25 50 100	+	$\pm$	+	$\pm$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	0	+	$\pm$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	$\pm$	+	$\pm$	+	0	+	0	+	0
Tétracycline 25 50 100	+	0	+	$\pm$	+	$\pm$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	0	+	$\pm$	+	$\pm$	+	0	+	0	+	$\pm$	+	$\pm$	+	0	+	0	+	0
	+	0	+	$\pm$	+	$\pm$	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0
Colimycine + Tétracycline 100 50	+	0	+	0	+	$\pm$	+	0	+	0	+	$\pm$	+	0	+	0	+	0	+	0
Colimycine + Bacitracine 100 50	+	0	+	0	+	$\pm$	+	$\pm$	+	$\pm$	+	$\pm$	+	$\pm$	+	$\pm$	+	$\pm$	+	$\pm$
Bacitracine + Tétracycline 50 50	+	0	+	0	+	0	+	$\pm$	+	$\pm$	+	$\pm$	+	+	+	+	+	+	+	+

E = Vitalité de l'explant
M = Prolifération microbienne.

Tableau n° 3.

De même J. André THOMAS et THIERRY en 1953 (243) lors de leurs expériences sur la survie d'organes adultes dans le liquide amniotique déprotéiné et purifié, démontrent que la durée de survie dépend de la concentration des fractions entrant dans la composition des ultra-filtrats.

Les points de congélation pouvant varier de $\Delta^{\circ} = - 19^{\circ}$ à $\Delta^{\circ} = - 0,56^{\circ}$, des organes de Rats adultes sont conservés aseptiquement à $+ 4^{\circ}\text{C}$ dans des fractions de liquide amniotique déprotéiné et purifié de concentration minérale décroissante. Après neuf mois et demi et vingt mois, la vitalité des organes ainsi conservés est éprouvée par mise en culture et les résultats suivants sont observés :

Pour un $\Delta^{\circ} = - 0,56^{\circ}$, après neuf mois de survie tous les organes conservés donnent d'abondantes cultures ; après vingt mois, de nombreuses cellules isolées émigrent encore à partir de certains organes (rate - coeur - poumons). Pour un $\Delta^{\circ} = - 0,48^{\circ}$ après neuf mois de nombreuses cellules émigrent encore des organes mis en culture ; mais pour un $\Delta^{\circ} = - 0,31^{\circ}$ après neuf mois, du coeur, de la rate, des reins, des vaisseaux n'émigrent que des cellules isolées ; le rein ne fournit qu'un mince liséré épithélial. Enfin pour un $\Delta^{\circ} = - 0,19^{\circ}$ après neuf mois, l'émigration cellulaire devient insignifiante.

Devant de tels résultats nous avons été amenés à mesurer les Δ° de nos solutions : saline seule, ou nutritive complète, et les comparer au Δ° du milieu interne des Planorbes.

L'hémolymphes de plusieurs gros Planorbes était recueillie par ponction intra-cardiaque à travers une fenêtre pratiquée dans la coquille. Puis un pool des différentes hémolymphes était constitué et la concentration moléculaire déterminée par la mesure cryoscopique de l'abaissement du point de congélation.

Le Δ° cryoscopique du milieu interne des Planorbes pris à plusieurs reprises, nous a donné des valeurs suivantes :

$$\begin{array}{l} \Delta^{\circ} \quad - 0,20^{\circ} \quad - 0,24^{\circ} \quad - 0,22^{\circ} \\ \text{dont la moyenne était} \quad \Delta^{\circ} = - 0,22^{\circ}. \end{array}$$

Ce chiffre confirme ceux obtenus par DUVAL en 1928 (81) chez Planorbis corneus, qui oscillaient entre $- 0,15$ et $- 0,24$ avec une moyenne de $- 0,21$.

L'abaissement du point de congélation de notre milieu salin de survie nous donnait un

$$\Delta^{\circ} = - 0,22^{\circ}$$

et celui de la solution nutritive

$$\Delta^{\circ} = - 0,25^{\circ}$$

Nous avons estimé donc que l'isotonie était suffisante pour assurer une bonne survie à nos explants.

5° - Evolution du pH du milieu final complet.

Nous savons que la survie des explants n'est compatible qu'avec des limites très strictes de pH. Une acidification (6, 7) ou une alcalinisation (8, 10) du milieu de survie entraîne la mort immédiate des tentacules.

Les pH des différentes solutions ont été suivis de façon à s'assurer que des variations notables n'avaient pas lieu lors de la conservation. Nous avons vu que la solution saline stock demeure relativement stable (cf courbes).

La solution finale l'est moins. Des variations de 7,07 à 7,65 ont été observées au cours de trois semaines. Aussi le stockage est-il fait en solutions mères. La solution complète est ajustée à pH 7,6. Les différentes fractions de la solution nutritive sont ajustées lors de leur préparation à pH = 7,5 (Sol. E), (Sol. F).

La solution d'antibiotiques, spécialement la tétracycline, acidifie notablement le milieu. Aussi avant la mise en survie de l'explant, la solution finale est-elle réajustée à pH = 7,6 à l'aide d'une solution de Na OH N/10.

CHAPITRE II.

ETUDE DE LA SURVIE DE L'EXPLANT

La solution nutritive définie au chapitre précédent est répartie dans des tubes à lamelles, à raison de 5 ml par tube. C'est dans cette enceinte que va être placé le tentacule prélevé ainsi qu'il a été décrit dans le chapitre "Méthode".

1° - Etude dynamique et morphologique du tentacule en survie.

Le tentacule une fois sectionné, se présente sous la forme d'un petit organe autonome. La surface est recouverte d'une file continue de cils vibratiles grâce auxquels il nage rapidement (fig. 4).

a) La cicatrisation (Pl II)

Si la section est nette, la cicatrisation est rapide. Elle s'opère en quelques heures par coaptation des lèvres de la plaie, la contraction des tissus rapproche les bords de la blessure, et une épidermisation complète la fermeture (Pl II fig. 9).

Lorsque la section est large, les tissus profonds laissent échapper une substance interstitielle qui forme un bouchon muqueux, les lèvres de la plaie s'enroulent légèrement et sont séparées par un caillot d'origine collagène. Au bout de quelques jours (deux jours) ce bouchon fait place à une mince couche épithéliale qui ferme la plaie (Pl II fig. 10, 11, 12).

b) L'évolution morphogénétique. La différenciation (Pl III)

Durant les premiers jours (quatre à cinq), le tentacule est doué d'une mobilité très vive, il se déplace rapidement dans toutes les directions. Les dix jours suivants, cette mobilité persiste mais diminue en intensité. Des périodes d'agitation succèdent à des temps de repos.

Les mouvements musculaires spontanés sont conservés une semaine. Ensuite ces mouvements persistent, mais seulement lors d'excitations (par exemple changement de milieu). Toutefois les cils continuent à battre jusqu'à la mort de l'explant.

Entre le dixième et le quinzième jour s'amorce le phénomène de dédifférenciation structurale (Pl III, fig. 13).

L'explant change de forme, les tissus internes semblent se contracter, le pigment se rassemble au centre, les cellules à mucus cessent leur sécrétion et se vident (Pl III fig. 14).

Durant la troisième semaine, la dédifférenciation s'accroît, elle devient profonde, corrélative à la dégénérescence des structures internes. Les muscles perdent peu à peu leur orientation. L'explant diminue de volume, devient ovoïde (Pl III, fig. 15), puis tend à prendre l'état d'équilibre le plus simple, c'est-à-dire la sphère ; la dépigmentation entraîne un éclaircissement de l'explant, et les structures internes deviennent très lacunaires (Pl III fig. 16).

En fin de survie, l'explant se présente sous la forme d'une petite sphère de volume très réduit, entourée d'une couronne de cils vibratiles grâce auxquels il se déplace dans le milieu. Le pigment se répartit également de façon circulaire et forme une ligne noire concentrique à l'intérieur des tissus qui eux, au contraire, sont éclaircis (Pl VII fig. 32).

Au début de la quatrième semaine apparaît le phénomène de pycnose et la mort intervient généralement au cours de la quatrième semaine.

2° - Etude histologique des tentacules en survie.

Les tissus d'un tentacule sain mis en survie, étudiés par des colorations trichromes, se présentent avec les caractéristiques suivantes :

a) L'épithélium de revêtement. C'est un épithélium pavimenteux simple recouvrant toute la surface du tentacule (Pl I fig. 5, 6). Il est constitué par une seule couche de grandes cellules épithéliales à protoplasme granuleux et à noyau allongé relativement riche en chromatine, contenant en outre quelques grains de pigment. La membrane externe de ces cellules est recouverte de cils nombreux, chacun fixé sur un corps parabasal situé juste sous la membrane.

C'est cet épithélium qui est responsable de la cicatrisation rapide.

b) Le tissu conjonctif interne. Le tissu conjonctif situé sous l'épithélium de revêtement est dense, relié à ce dernier par des fibroblastes. Ceux-ci, qui constituent la majeure partie de ce tissu possèdent un grand pouvoir de transformation. Ils apparaissent comme des cellules allongées pouvant avoir plusieurs prolongements et contiennent un noyau ovale modérément riche en chromatine ; le protoplasme rare est souvent peu visible. Ils sont souvent pigmentés et seraient peut être les précurseurs des cellules pigmentaires, que l'on rencontre en abondance dans la profondeur.

Ces dernières, de formes variables, ont un noyau souvent excentrique, riche en chromatine. L'augmentation de leur nombre est fréquemment observée lors d'infections des Mollusques.

De plus, on rencontre dans ce tissu dense des fibres voisines des fibres collagènes, qui se colorent lors des colorations trichromes, mais ne prennent pas les imprégnations à l'argent.

Enfin, quelques cellules à mucus y sont réparties, ce sont des cellules qui ont souvent la forme d'une larme ; elles mesurent environ 23 μ dans leur plus grande largeur et leur noyau est très riche en chromatine. Elles ne possèdent pas de canal excréteur ; lorsqu'elles sont pleines, elles libèrent directement leur mucus ; à ce moment le noyau devient picnotique. Dans les cellules en activité ce noyau, d'ailleurs, est souvent masqué par de nombreuses granulations basophiles qui donnent une réaction P. A. S. fortement positive.

Par endroit ce tissu conjonctif dense s'éclaircit pour devenir plus vasculaire et faire place à des sinus sanguins remplis d'hémolymphe (Pl. II fig. 9). C'est le "Zirkulation-stück" de KISKER. Ce tissu contient également quelques "concrétions éléments à structure pseudo-cristalline qui se colorent en bleu par l'hématoxyline.

c) Les fibres musculaires.

De nombreuses fibres musculaires lisses courent le long des tentacules ; celles-ci ont la structure des fibres musculaires lisses des Vertébrés. Cependant elles sont très minces avec une partie légèrement plus épaisse au niveau du noyau. Ce dernier est de forme allongée et ovale. (Pl. I fig. 8).

De même que le signale BAEKER (1932), dans son travail sur les Mollusques terrestres, il n'existe pas chez le Planorbe de fibres élastiques vraies.

Le long des fibres musculaires, les myofibrilles sont abondantes et, entourant chaque fibre musculaire, on peut déceler par des imprégnations à l'argent, de très délicates fibres nerveuses.

Etude histologique de l'évolution et de la dédifférenciation dans le tentacule au cours de la survie (Pl. IV).

a) L'épithélium conserve jusqu'à la mort de l'explant sa structure. Après la cicatrisation, il se reforme une couche épithéliale monostratifiée qui enveloppe l'explant sans discontinuer. Sous l'effet des contractions musculaires celle-ci se plisse ou s'étend. La bordure de cils vibratiles continue à battre jusqu'à la mort de l'explant, ces derniers semblent cependant moins longs.

b) Le tissu musculaire.

Le phénomène qui, le premier, dénote l'évolution du tissu musculaire, est la perte d'orientation des fibres. Dès la deuxième semaine de survie, celles-ci se répartissent dans toutes les directions, les myofibrilles qui les entourent dégènèrent en même temps. (Pl IV fig. 18).

Au cours de la troisième semaine on ne retrouve les fibres musculaires que sous la forme de simples tronçons repartis anarchiquement (Pl IV fig. 19). Puis vers la quatrième semaine, ces fibres disparaissent parfois complètement et seuls demeurent des sarcolytes disséminés à l'intérieur de la sphère que constitue l'explant à ce moment (Pl IV fig. 20).

Nous verrons ultérieurement que la direction des fibres est maintenue plus longtemps, lorsqu'un élément nerveux important est conservé dans l'explant.

c) Le tissu conjonctif.

C'est au niveau de ce tissu que la dédifférenciation est la plus prononcée. Le tissu conjonctif proprement dit subit le remaniement le plus intense au cours de la survie. Durant la première semaine, peu de changements sont visibles (Pl IV fig. 17), puis le tissu conjonctif devient de moins en moins dense (Pl. IV fig. 18). A la fin de la première quinzaine les fibroblastes sont plus nombreux ; cependant aucune mitose n'a jamais pu être observée. Les cellules à mucus perdent peu à peu leur pouvoir sécréteur et se vident conjointement à l'évolution des fibroblastes. Les cellules à pigment se répartissent en amas irréguliers et prennent souvent une disposition concentrique parallèle à la forme générale de l'explant (Pl VII fig. 32). Ensuite, les noyaux deviennent de plus en plus picnotiques, les loges cellulaires confluent et forment de vastes cavités. Le volume total est progressivement réduit de façon souvent considérable ; en fin de survie l'ensemble de l'explant représente le tiers du volume initial. A ce moment (fin de la troisième semaine de survie), l'explant se présente sous la forme d'une sphère ciliée où, dans une structure très lacunaire, le tissu conjonctif tend à former un réseau qui remplit presque totalement la cavité de la

sphère ; cependant que la masse centrale est formée de cellules libres séparées par des zones claires semblant dépourvues de cellules (Pl III fig. 16) (Pl IV fig. 20).

La différenciation est toujours plus rapide pour les tentacules de petite taille. Ceux sectionnés chez des Planorbes adultes se différencient plus lentement.

3° - Rôle du système nerveux dans la différenciation des tissus.

Nos résultats sont conformes à ceux obtenus par J. André THOMAS au cours de ses travaux sur la survie expérimentale d'organes d'Echinodermes et de Batraciens : A la suite de l'hypothèse émise par cet auteur en 1941 sur le rôle essentiel du système nerveux dans le maintien de la différenciation, il nous a paru indiqué d'étudier le rôle des éléments nerveux sur le processus de la régression structurale de nos explants.

Nous nous sommes donc proposés de rechercher les corrélations possibles entre leur différenciation structurale et la dégénérescence des éléments nerveux.

Etude histologique de l'évolution du système nerveux dans un tentacule en survie (Pl V).

L'étude du système nerveux d'un tentacule en survie depuis deux jours révèle des caractéristiques identiques à ce que l'on observe dans un tentacule non séparé du Planorbe. C'est-à-dire que les imprégnations à l'argent mettent en évidence un tronc nerveux en provenance du ganglion central qui traverse le tentacule dans toute sa longueur et se ramifie en de nombreuses petites branches radiales le long des travées du tissu conjonctif. (Pl V, fig. 21, 22, 23).

Il n'a pas été reconnu de ganglion périphérique à la base du tentacule, mais il a été décrit à l'endroit de l'élargissement en forme de feuille, un massif de cellules sensorielles groupées par flots, séparés par des fibroblastes (Pl I fig. 6) (Pl IV fig. 19) (Pl V fig. 24).

Bien que la nature exacte de ces cellules n'ait pas été encore clairement définie, elles présenteraient la même structure que les cellules ganglionnaires chromatiques du ganglion central, avec un cytoplasme lacuneux très basophile et un noyau riche en chromatine, (elles sont reliées par une extrémité à la masse des neurofibrilles issues du nerf central du tentacule, et par l'autre extrémité elles sont en contact étroit avec l'épithélium externe).

Il nous faut encore signaler, situé latéro-postérieurement à la base de chaque tentacule, dans le repli de l'épithélium, la présence d'un oeil (décrit précédemment) richement innervé grâce à un tronc distinct du tronc central du tentacule (Pl I fig. 5, 6 : Pl VIII).

Au cours de la survie ces éléments nerveux dégénèrent (Pl VI). Entre le huitième et le treizième jour de survie, les cellules nerveuses commencent à disparaître, et les nerfs semblent se résorber (Pl VI fig. 25, 26). Entre la deuxième et la troisième semaine de survie, seules demeurent les cellules nerveuses de la neuroglie qui bientôt se confondent avec les fibrocytes (fin de la troisième semaine). Puis dans les jours suivants, les cellules de la neuroglie envahissent le trajet des neurofibrilles, et se répartissent anarchiquement (Pl VI fig. 27). En fin de survie, on ne trouve à l'intérieur de la sphère que des flots de cellules de la neuroglie en dégénérescence (Pl VI fig. 28).

A défaut de la présence d'un ganglion périphérique à la base du tentacule, nous avons donc, dans une double série d'expériences, essayé, 1) la survie de l'explant en présence du massif ganglionnaire et de l'oeil, et d'autre part, 2) celle de tentacules sectionnés en l'absence de ces deux structures.

Parallèlement, dans une autre série expérimentale, nous avons analysé les relations entre la dégénérescence du système nerveux et la différenciation structurale de l'explant.

Pour ce faire, nous avons prélevé des explants tous les trois jours dans nos séries en survie et nous avons fait l'étude histologique, comparant l'organisation interne à l'état de conservation ou de dégénérescence du système nerveux mis en évidence par des méthodes d'imprégnation argentique.

D'une telle étude les faits suivants se dégagent :

a) Evolution comparative des explants pourvus ou dépourvus d'éléments nerveux. (Pl. VII).

La présence d'éléments nerveux importants, comme les cellules ganglionnaires, et l'oeil, semblent en relation directe avec la conservation de la forme de l'explant.

En présence de ces deux structures, la forme allongée de l'explant persiste douze à quinze jours et même quelquefois plus, contre neuf jours en leur absence.

Au bout de douze jours de survie, chez un tentacule, pourvu de son oeil, la forme et la structure interne sont encore conservées (Pl VII fig. 29) ; on note la persistance de l'orientation des fibres musculaires, la présence de la gouttière centrale et le maintien de l'organisation tissulaire. La structure de l'oeil est elle-même inchangée. Chez un tel explant les contractions sont nombreuses, et celui-ci réagit vivement à chaque excitation.

Dans le même temps (douze jours) chez un tentacule maintenu en survie sans éléments nerveux importants, la dégénérescence est plus rapide (Pl. VII fig. 30). La forme extérieure a changé, l'organisation en sphère apparaît déjà. En outre, la différenciation des tissus internes est prononcée, les fibres musculaires ont perdu leur orientation et se répartissent en tronçons, le tissu conjonctif est moins dense, les cellules à mucus ne sécrètent plus, et le pigment se rassemble en amas. La perte de mouvements musculaires spontanés est presque complète, seuls les cils vibratiles de l'épithélium permettent les déplacements.

La dégénérescence des nerfs est corrélative du changement de forme de l'explant et intervient dans la perte des contractions spontanées. C'est entre le treizième et le seizième jour de survie, en présence de l'oeil, vers le huitième jour en son absence, que le système nerveux dégénère ; cette dégénérescence (voir page précédente) est conjointe de la perte de l'orientation dans le tentacule. Au fur et à mesure de la dégénérescence des fibres nerveuses, l'orientation en ovoïde, puis en sphère s'effectue (Pl VII fig. 31), lorsqu'il n'existe plus de fibres nerveuses l'explant à la forme d'une sphère parfaite (Pl VII, fig. 32).

b) Relation entre les phénomènes de dégénérescence et la présence de l'oeil. (Pl VIII)

La dégénérescence de l'oeil est parallèle à celle du système nerveux et semble commander l'organisation des tissus environnants. Les figures de la planche VIII illustrent ce phénomène.

Dans un explant en survie depuis deux jours l'oeil présente encore une structure inchangée (fig. 33), la capsule optique est intacte, les cellules de la rétine n'ont subi aucune dégénérescence, le pigment n'a pas émigré et reste très dense.

Dans un explant de huit jours de survie, l'évolution de l'oeil débute (fig. 34). Cependant les structures sont encore très visibles.

La capsule optique est encore parfaitement nette. Les deux catégories de cellules constituant la rétine (sensorielles et pigmentées) sont distinctes. Le pigment très dense emplit la zone interne.

Dans un explant après douze jours de survie (fig. 35) l'oeil montre une dégénérescence profonde accompagnée de différenciation tissulaire.

Les structures propres à l'oeil du Planorbe ne se retrouvent plus, sa forme a changé ; la capsule optique et les cellules de la rétine ont disparu, le pigment tend à envahir toute la zone oculaire.

Dans un explant en survie depuis vingt jours, la dégénérescence de l'oeil est complète (fig. 36), aucune des structures primitives n'est plus visible, seule une masse pigmentée marque l'emplacement de l'oeil.

Cette dégénérescence de l'oeil semble commander la dédifférenciation des tissus voisins. L'évolution parallèle des structures tissulaires autour de l'oeil peut être suivie d'une façon régulière dans les quatre photos de la planche VIII. La dédifférenciation et la dégénérescence sont de plus en plus prononcées au fur et à mesure de l'évolution régressive des structures oculaires.

Nous avons vu au paragraphe précédent que cette dédifférenciation était également liée à la dégénérescence des éléments nerveux. Il nous est impossible de déterminer le rôle exact de chacune de ces structures. L'oeil joue-t-il un rôle par lui-même, ou seulement par l'apport d'éléments nerveux importants supplémentaires ? Notre expérimentation ne nous permet pas de le dire ; quoiqu'il en soit, il nous paraît indéniable que, parmi l'ensemble des facteurs déterminants que les expériences permettent d'envisager, il apparaît que la présence d'éléments nerveux joue un rôle sur la persistance de la différenciation ; en l'absence de ces éléments, la dédifférenciation structurale des explants de Planorbes en survie est certainement plus rapide et plus profonde.

CHAPITRE III.

ESSAIS D'INFESTATION DES EXPLANTS EN SURVIE PAR
DES MIRACIDIUMS DE SCHISTOSOMA MANSONI1° - Etude du comportement des miracidiums dans le milieu de survie.

La première condition nécessaire à l'infestation de nos explants par les miracidiums de *Schistosoma mansoni* était que la vitalité des larves ne soit en rien touchée par les composants du milieu de survie.

Nous avons donc, dans des expériences préliminaires, testé la vitalité et la longévité des miracidiums dans le milieu nutritif complet, par rapport à celles constatées dans les conditions naturelles optima.

Ces conditions ont été déterminées en 1963 (9) pour nos souches entretenues au laboratoire; La vitalité la meilleure était observée à des températures situées entre 22° et 28° à un pH de 7, 5 à 8, 5. Les concentrations toxiques en sel (ClNa) débutaient au-delà de 4 ‰.

Dans de telles conditions, la durée de vie des miracidiums fraîchement éclos était de neuf heures.

Comparativement les résultats obtenus dans notre milieu de survie peuvent être résumés ainsi :

Température du milieu	Durée de survie
30°	2 heures
20°	8 heures
15°	10 heures
10°	12 heures

La zone de mobilité et de vitalité maxima (mouvements rapides mais non trop accélérés - bonnes réponses à des excitations), se situent à des températures oscillant entre 18° et 20°. D'autre part, la

concentration ionique de notre milieu est parfaitement compatible avec les taux tolérés par le miracidium (0 à 6 ‰) de ClNa (cf. étude du Δ° cryoscopique de la solution).

2° - Essais d'infestation des explants.

Ces préliminaires établis, nous avons tenté l'infestation de l'explant par des miracidiums fraîchement éclos. Les premiers essais furent faits avec des explants prélevés sur un Planorbe d'une souche hautement réceptive (90 %). Dans une deuxième série d'expériences nous avons essayé l'infestation de tentacules de Planorbes "semi réceptifs" (souche Brésil). Puis dans une troisième série, nous avons tenté l'infestation d'explants provenant de Planorbes tout à fait réfractaires (Pl. corneus), afin d'étudier certains problèmes relatifs à la spécificité très stricte observée chez les différentes souches d'A. glabratus.

En effet, de nombreux auteurs ont étudié la spécificité hôte-vecteur-parasite entre les Mollusques et les formes larvaires des Schistosomes sans arriver à des conclusions formelles, quant au déterminisme du choix et de l'implantation d'un miracidium dans les tissus d'un Mollusque.

Dans le cas de Schistosoma mansoni ayant comme hôtes vecteurs principaux certaines espèces de Mollusques pulmonés du genre Planorbis ; les travaux des divers auteurs, depuis Emile ROUBAUD en 1918 (199) LUTZ (1916-1919) (161-162), FAUST et coll. (1934-1935) (83 à 85), BRUMPT (1936-1941) (30-31), VOGEL (1941) (251), CRAM et coll. (1945-1946) (61 à 64), NEWTON (1952) (184), MALDONADO et ACOSTAMATIENZO (1947) (169), COWPER (1947) (60), OLIVIER et MAO (1949) (187), BROOKE (1953) (25), SUDD (1960) (225), font état d'une spécificité réelle très étroite, géographique même, qui préside à l'évolution du parasite chez son hôte. Cependant, tous les degrés possibles d'infestation peuvent être observés expérimentalement, depuis une absence complète d'"attraction" des embryons ciliés, jusqu'à une attraction et une pénétration abortive aboutissant à des stades plus ou moins avancés d'évolution.

Dans notre expérimentation, tous les résultats obtenus avec les explants furent comparés à ceux observés chez les Planorbes entiers, étudiés au même stade évolutif du parasite.

A - Comportement du miracidium vis-à-vis de l'explant provenant d'un Mollusque réceptif "Planorbis glabratus".

La théorie de l'attraction miracidienne par les Mollusques hôtes vecteurs est encore très discutée, c'est pourquoi il nous a paru intéressant d'étudier le comportement du miracidium vis-à-vis de l'explant en survie.

Techniquement lors d'un changement de milieu l'explant était transvasé dans une petite boîte de Petri contenant du milieu de survie frais, et on introduisait concurremment dans cette enceinte deux ou trois miracidiums fraîchement éclos.

Le devenir de l'embryon et de l'explant pouvait ainsi être facilement observé sous une loupe binoculaire.

a) Etude dynamique :

Devant un explant fraîchement sectionné, le comportement des miracidiums est très semblable à celui observé envers un Planorbe vivant.

L'attraction "miracidienne" est comparable et paraît être de même nature.

Les miracidiums semblent d'abord ignorer l'explant, puis au bout d'un temps variable ils se rapprochent, forment des cercles, puis attaquent, repartent, puis reviennent définitivement pour se fixer. Le temps de latence avant l'attaque peut durer une demi-heure.

Pénétration du miracidium.

Une fois fixé par le térébratorium, le miracidium grâce à deux mécanismes conjoints, l'un physique, constitué par les fortes contractions de tout son corps, l'autre chimique, grâce à l'enzyme protéolytique contenu dans les glandes céphaliques de pénétration, s'introduit activement à l'intérieur de l'explant.

Dès son introduction complète, il subit un "pelling", la membrane ciliaire et le térébratorium sont rejetés; ils sont résorbés et disparaissent en moins de trois heures. A ce stade les cellules germinatives se multiplient et en l'espace de vingt quatre heures donnent des sporocystes mères généralement de forme ronde.

b) Etude histologique de l'évolution des miracidiums dans un explant prélevé sur un Planorbe réceptif de la même origine géographique.

L'évolution normale du miracidium de *Schistosoma mansoni* à l'intérieur des Planorbes est en principe tout à fait comparable à celle des autres Trématodes. Cependant de nombreux auteurs tels que FAUST et HOFFMANN (84 - 85), GORDON, DAVEY et PEASTON (115), LUTZ (161 - 162) BRUMPT (30), ITURBE et GONZALES (130) (131), CORT et son école (52 à 54), SUDDS (225), etc. . . qui ont étudié l'évolution des différents Schistosomes chez le Mollusque, n'arrivent pas toujours aux mêmes constatations et seuls MALDONADO et

ACOSTA MATIENZO (1947) (169), puis OLIVIER et MAO (1949) (187) étudient en détail le développement complet de S. mansoni dans son hôte vecteur le Mollusque.

Nous reprendrons donc l'étude histologique de l'évolution de S. mansoni dans Planorbis glabratus, souche de Pointe à Pitre, parallèlement à celle de l'évolution des larves dans nos explants.

Pour ce faire, dès l'infestation et ensuite à intervalles réguliers, des explants en survie et des Planorbes infestés simultanément seront fixés, inclus, coupés, colorés par les méthodes histologiques décrites au chapitre "Méthodes".

LES SPOROCYSTES MERES. Pl IX et X.

Il faut tout d'abord signaler que l'évolution des Schistosomes dans le Planorbe de même provenance géographique n'a jamais donné lieu à une réaction cellulaire chez l'hôte. Ceci est un fait maintenant bien établi [(OLIVIER et MAO 1949) (187), (NEWTON 1952) (184), (SUDDS 1960) (225)] .

Le miracidium évolue d'une façon identique dans l'explant ou dans le Mollusque entier jusqu'au stade sporocyste fille.

Le début du stade "sporocyste mère" est difficile à déterminer avec précision. Le miracidium, dès qu'il a pénétré dans les tissus du Mollusque, commence sa multiplication germinative. Toutefois, on situe ordinairement le début du stade sporocyste dès la vingt quatrième heure. Pl IX fig. 36, 38.

Les sporocystes mères se présentent comme des sacs à parois très minces difficilement visibles, de forme ronde ou ovale complètement remplis de cellules contenant un protoplasme granuleux et un réseau de granules réfringents d'une taille supérieure.

La fig. 39 de la Pl. IX illustre ce phénomène dans les tissus du Mollusque in vivo. Les figures 41, 42, 43, 44, de la Pl. X montrent les stades correspondants dans le tentacule en explant.

Cependant, vers le quatrième jour après l'infestation, une certaine différenciation dans les cellules germinatives en pleine prolifération devient visible. Pl IX fig. 40 dans le Mollusque - Pl X fig. 43, 44 dans l'explant.

On voit apparaître les "masses germinatives" formées par la division des cellules germinatives originales. A ce stade, le contenu des sporocystes-mères se compose de nombreuses cellules germinales, parmi lesquelles se détachent quelques petits embryons de sporocystes-filles de taille plus petite, composés de deux à huit cel-

lules. Au fur et à mesure du développement des sporocystes mères, le nombre des embryons augmente, tandis que le nombre des cellules germinales isolées diminue (type I). Le nombre de ces masses germinatives ou embryons peut atteindre trois cents par sporocyste-mère.

Les SPOROCYSTES-FILLES. Pl XI, XII.

Vers la deuxième semaine, les sporocystes filles sont déjà bien évolués et se présentent sous la forme de sacs allongés à parois minces, remplis de cellules germinales (type II).

Les figures 45 et 46 de la planche XI illustrent ce stade.

Dans le Mollusque in vivo.

C'est à cette époque que chez le Mollusque, les sporocystes filles doués de mouvements propres, commencent à quitter les sporocystes-mères et migrent (Pl XI fig. 47) vers l'hépatopancréas et la glande hermaphrodite, où ils se fixent irréversiblement avant de continuer leur évolution.

Les cellules germinales se différencient en petits embryons, ébauches de cercaires, puis dans un temps plus ou moins long (le temps de maturation n'est pas absolu), le corps de la cercaire se dessine par élongation et constriction de la partie médiane ; puis la queue se différencie, et les autres structures suivent jusqu'à la maturation complète et la sortie des cercaires par effraction à l'extérieur du corps du Mollusque (cinq à six semaines) Pl XI fig. 48.

Dans l'explant :

Dans le tentacule en explant, à la même époque (deuxième semaine après l'infestation) l'évolution des sporocystes se poursuit in situ, mais sans migrations. Pl XII fig. 49, 50.

Les sporocystes mères évoluent en sporocystes-filles par multiplications germinatives. On retrouve les sacs allongés à parois minces où débute la différenciation des futures embryons (Pl XII fig. 51-52). Cette évolution se poursuit jusqu'au stade III, puis s'arrête à ce stade. Nous n'avons jamais pu obtenir d'embryons complètement différenciés, et encore moins de cercaires. L'évolution, normale jusqu'alors, est soudain bloquée définitivement.

Dans ce développement il y a continuité germinative, les cellules germinales primordiales passent du miracidium aux sporocystes-mères. Les cellules de la lignée germinale se continuent dans les sporocystes-filles, puis dans les cercaires et deviennent les cellules génitales de l'adulte.

La multiplication germinative s'effectue par des divisions successives des cellules germinales déjà présentes dans le miracidium, jusqu'à la formation de masses germinatives dont les composants, par clivages réguliers et successifs, donneront les embryons cercariens.

Des caractères morphologiques définis n'apparaissent que tardivement dans cette évolution; toutes les possibilités de l'embryon sont mobilisées en premier par les cellules germinatives.

Il nous paraît intéressant de noter que l'évolution dans l'explant s'effectue d'une façon normale, dans le temps où la différenciation tissulaire du tentacule en survie est encore peu accusée.

Celui-ci à partir de la troisième semaine, date à laquelle s'arrête l'évolution du parasite, tend à prendre l'aspect d'une sphère indifférenciée. De ce fait, l'explant ne contient plus de substances de réserve et le parasite n'est pas en mesure de prélever les matériaux nécessaires à son développement dans le milieu de survie. Pl XII fig. 49-50.

B - Etude histologique de l'évolution du miracidium de *S. mansoni* dans des explants ou des tissus d'un Mollusque hôte vecteur d'une autre provenance géographique.

Dans une deuxième série d'expériences nous avons étudié les formes évolutives ou abortives, obtenues dans un explant infesté par un miracidium issu d'une souche de Schistosomes de provenance géographique différente de celle du Planorbe ayant fourni l'explant.

Une étude histologique comparative de ces formes a été faite avec celles obtenues dans les tissus d'un Mollusque entier infesté conjointement à l'explant. Cette étude a été entreprise pour vérifier la spécificité de race qui, dans la nature est bien connue des épidémiologistes. Ainsi un embryon issu d'un oeuf, provenant d'une souche de Schistosomes récoltée à Porto Rico, se montre incapable d'évoluer complètement chez un Planorbe vecteur dans sa région : Planorbis glabratus provenant de Brésil. La larve, après pénétration se trouve "en impasse" dans les tissus de l'hôte. C'est un engagement abortif.

Ces phénomènes ont été décrits chez le Mollusque par NEWTON en 1952 (184) et par BROOKE en 1953 (25) pour *S. mansoni*. Ils ont également été rapportés par RICHARD H. SUDDS en 1962 (225), qui étudia quatre espèces différentes de Schistosomes, deux provenant d'oiseaux, *Trichobilharzia elvae* et *T. physellae*, et deux formes infestantes pour les Mammifères : *Schistosomatium douthitti* et *S. mansoni*.

Des réactions cellulaires importantes chez l'hôte "anormal" conduisent à la destruction du parasite entre vingt quatre et six jours.

Pour nos propres expériences, dans le cas d'un Planorbe du Brésil ou d'un explant prélevé sur ce dernier, soumis expérimentalement à la pénétration d'un miracidium de *S. mansoni* provenant de Porto Rico, la pénétration a lieu d'une façon normale, semblable à celle qui aurait lieu chez un Mollusque de même souche géographique.

Dans le Mollusque : (Pl XII)

Dès que le miracidium a pénétré et essayé de poursuivre son développement, une très forte réaction cellulaire se produit dans les tissus de l'hôte autour du parasite. Pl XIII fig. 53 et 54.

A partir du troisième jour, une véritable lésion constituée par le parasite apparaît, d'environ 55 microns de diamètre, de forme ronde avec un cytoplasme obscur et des noyaux nécrotiques. Au centre, on trouve un matériel éosinophile granulaire. Les tissus autour des miracidiums sont constitués de cellules disposées en rond et bien délimitées provenant de tissus normaux. Ces cellules ressemblent à des fibroblastes (onze sur 2 à 4 microns) irrégulières, fusiformes, avec un cytoplasme basophile et un noyau allongé, elles forment un mur de 4 à 5 μ d'épaisseur. Pl XIII fig. 55 et 56.

Les cellules germinatives du miracidium avortent alors et meurent, laissant un amas cellulaire indéfini qui est envahi par des fibroblastes et les fibres du collagène, et se trouve par la suite résorbé par les tissus de l'hôte. Extérieurement, il donne naissance à une sorte de petite tumeur qui disparaît ensuite.

Ces infiltrats peuvent être décélés de quarante huit heures au quatrième jour de l'infestation au plus tard. Les figures obtenues par nous-mêmes sont très semblables à celles décrites par les auteurs précités.

Dans l'explant.

La planche XIV illustre les mêmes phénomènes dans l'explant en survie.

Le miracidium, ayant pénétré, tente de poursuivre son développement et la formation de sporocystes-mères s'ébauche (fig. 57 - 58).

Cependant très vite (douze heures) ceux-ci avortent, la multiplication germinative est arrêtée ; les masses germinales dégénèrent

(fig. 59 et 60), bien que la dédifférenciation structurale de l'explant ne soit pas encore amorcée (fig. 59), et que les fibres musculaires gardent leur orientation.

Au bout de deux jours on ne retrouve plus qu'un amas cellulaire en pleine anarchie (fig. 60).

A la différence de ce qui se passe dans le Mollusque, il n'y a pas de formation de "coque" fibreuse. Les réactions cellulaires des tissus de l'hôte paraissent absentes. Il y a simple refus et destruction du parasite sans que des mécanismes réactionnels des tissus environnants entrent en jeu.

Les barrières tissulaires dues à des réactions antigéniques ou de défense par l'intermédiaire du système histiocyttaire sont donc absentes dans l'explant.

C - Comportement des miracidiums vis-à-vis d'un explant ou d'un Planorbe entier réfractaire à l'infestation (Pl. corneus).

Aucune infestation n'a jamais été possible ni de Planorbis corneus jeunes ou adultes ni d'explants fraîchement sectionnés sur des individus de cette espèce, par les miracidiums issus de notre souche de Pointe à Pitre. Quelque soit l'âge du sujet testé, aucune "attraction" miracidienne, aucune tentative de pénétration n'a jamais été observée.

D - Rôle de l'âge de l'explant dans l'attraction et la pénétration du miracidium.

Les résultats rapportés aux paragraphes précédents sont relatifs à des explants fraîchement sectionnés. Ils nous a paru intéressant de rechercher l'influence de l'âge de l'explant et par là même, de la dédifférenciation structurale plus ou moins avancée, sur le comportement du miracidium.

Le problème était le suivant : la différenciation structurale, est-elle le support de la spécificité et par là même, la dédifférenciation entraîne-t-elle la disparition de cette spécificité ? C'est-à-dire le miracidium va-t-il être capable de pénétrer un explant prélevé sur un Planorbe de n'importe quelle origine, à partir du moment où la dédifférenciation est amorcée ou même complète ?

a) Cas d'un Mollusque réceptif.

Jusqu'au quatrième jour de survie, les phénomènes d'attraction et de pénétration sont les mêmes que pour un explant fraîchement sectionné. Entre le quatrième et le huitième jour l'attraction semble avoir disparu totalement ; la pénétration se fait par hasard et plus

difficilement ; certaines infestations avortent. A partir du dixième jour de survie, la pénétration est exceptionnelle ; après le douzième jour elle ne survient jamais.

Les possibilités de pénétration semblent donc bien dues au maintien d'une certaine différenciation structurale. Au fur et à mesure que s'installe la dédifférenciation, la pénétration du miracidium dans l'explant devient de plus en plus aléatoire, et lorsque la dédifférenciation structurale du tentacule en survie est complète, la pénétration ne peut plus avoir lieu.

La perte de structures organisées ne conduit donc pas à la désépécification, ainsi que nous en avons émis l'hypothèse. Il paraît au contraire nécessaire au parasite de rencontrer certains tissus, ou certaines substances contenues dans ces tissus et excrétées par eux, pour pouvoir pénétrer son hôte et poursuivre son développement.

b) Cas d'un Mollusque semi-réceptif.

La perte de la possibilité de pénétration se produit encore plus rapidement que dans le cas précédent. Au-delà du cinquième jour de survie aucune pénétration n'est plus observée.

c) Cas d'un Mollusque réfractaire.

Un phénomène inattendu s'est produit au regard des explants prélevés chez des *Planorbis* corneus.

Rappelons que chez l'individu entier toute pénétration a toujours été impossible, quelques soient les conditions expérimentales.

Dans des tentacules en survie depuis moins de quatre jours, aucune pénétration ne s'est jamais produite. Mais chez des tentacules en survie depuis quatre, cinq, six jours, nous avons pu assister à des tentatives de pénétration par des miracidiums issus de la souche de Pointe à Pitre. Ceux-ci attaquent l'explant, s'implantent à la surface et vident le contenu de leurs glandes céphaliques à l'intérieur des tissus du tentacule. Cependant dans aucun cas, ces essais de pénétration ne sont couronnés de succès. Le miracidium abandonne sa proie, tourne en rond et meurt.

Après huit jours de survie on n'assiste plus à aucune tentative de pénétration.

A la lumière de ces faits, nous avons tenté d'aborder le problème de la spécificité du choix d'un Mollusque par des miracidiums.

TROISIEME PARTIE

Recherches relatives aux facteurs responsables de la spécificité du choix d'un Mollusque par les miracidiums.

CHAPITRE I

CONSTATATIONS EXPERIMENTALES.

De nombreux auteurs ont signalé la spécificité du choix des miracidiums issus de l'oeuf de *S. mansoni*, envers certains Mollusques vecteurs. Ils ont noté les limites très étroites des possibilités de développement des embryons dans les tissus du Mollusque-hôte, sans arriver à des conclusions formelles, quant au déterminisme du choix et de la résistance partielle ou complète de certains Mollusques.

Le premier, LORTET en 1905 (160) avant même que les modes d'évolution et de transmission des Schistosomes soient connus, avait effectué des expériences d'infestation comparative de nombreuses espèces de Lymnées et de Planorbes, en versant des oeufs et des embryons de Schistosomes dans un aquarium peuplé de Mollusques d'espèces variées. Cependant, étant donné l'époque de ces recherches, aucune explication n'était donnée par l'auteur sur ses résultats négatifs.

Puis vinrent les travaux de LUTZ en 1916-1917 (161-162) au Brésil, où il signale que les Physes et les Planorbes seuls sont susceptibles de s'infester par *S. mansoni* avec cependant la possibilité d'une évolution complète chez une seule espèce de Planorbes : *P. olivaceus*. Chez les autres Planorbes, en particulier *P. ferrugineus* et *P. terragophilus*, l'attraction miracidienne se produit bien, mais l'évolution ne se poursuit pas.

A la même époque, ITURBE et GONZALES (131) au Venezuela ont reconnu que la seule espèce chez laquelle l'évolution complète se produisait était : *P. guadalupensis*, tandis que chez *P. cultratus* on n'observait qu'une simple pénétration sans évolution ultérieure et, que chez *Physa rivalis* l'attraction miracidienne ne se produisait même pas.

Plus tard, nous trouvons les travaux de FAUST et HOFFMANN en 1934 (84 et 85), E. BRUMPT en 1936 (30), puis en 1941 VOGEL (251) ; la même année CRAM et ses collaborateurs (61 à 64), surtout FILES (88) (89), qui le premier signale l'incompatibilité entre les souches de Brésil et de Porto Rico, STUNKARD (H. W.) en 1946 (224), COWPER en 1947 (60), LAGRANGE et SCHEECQMANS en 1950 (151) notent la résistance partielle ou complète de certaines espèces de Mollusques, hôtes vecteurs présomptifs, à l'infestation par des miracidiums de S. mansoni. A cette époque, l'opinion la plus répandue est que la sélection du Mollusque par le miracidium se fait grâce à une attraction due à une substance chimiotactique spécifique libérée par le Mollusque.

Puis cette théorie est peu à peu abandonnée, et le choix du

Puis cette théorie est peu à peu abandonnée, et le choix du Mollusque par l'embryon devient pour les auteurs, purement occasionnel ; le déterminisme de la pénétration serait livré au hasard. C'est l'opinion d'ABDEL-MALEK en 1950 (1) travaillant sur une souche de Biomphalaria boissyi très susceptible à l'infection par une souche de S. mansoni provenant d'Egypte, mais réfractaire à une souche de S. mansoni provenant de Porto Rico.

LARUE en 1951 (153) croit cependant au stimulus chimique à courte distance, mais conclut que le choix est plus ou moins un phénomène de chance. Pour STIREWALT en 1951 (220), tout est surtout question de hasard.

Enfin en 1952 NEWTON (184), entreprend la première étude histologique comparative, après infestation par la même souche de Schistosomes, des tissus de deux souches de Mollusques. L'une, hautement réceptive provenant de Porto-Rico, l'autre, en provenance de Brésil, ne permettant qu'une évolution abortive vis-à-vis de la souche de Schistosome considérée. La souche de Porto-Rico s'accommode des parasites sans réaction apparente ; la souche de Brésil, au contraire, présente dans ses tissus une infiltration cellulaire importante avec destruction des larves infestantes en moins de quarante heures.

Dans une seconde étude en 1953, (185) cet auteur affirme que la susceptibilité d'A. glabratus à l'infection par S. mansoni est due à un caractère génétique héréditaire. Mais la même année MACQUAY (166) infirme cette affirmation, car d'après ses expériences la susceptibilité ne se transmettrait pas selon les lois de MENDEL, la sensibilité augmentant dans les générations issues de croisement entre parents non susceptibles et susceptibles.

A la même époque KUNTZ (149) étudiant la sensibilité de Planorbes provenant de Porto-Rico, du Venezuela et d'Egypte, à une même souche de S. mansoni, confirme les travaux de FILES (89) et NEWTON (184) quant à la résistance selon la provenance géographique.

En 1953 BROOKS (25) publie une étude comparative de l'évolution de *S. mansoni* dans *Tropicorbis havanensis* et *Australorbis glabratus*. Si le développement se poursuit sans réactions chez *A. glabratus*, chez un grand nombre de sujets de *Tropicorbis havanensis*, par contre, il note une réaction tissulaire importante et la résorption rapide de la larve après pénétration (trois heures à quinze jours). Il attribue le fait d'un "bon" développement à des caractères intrinsèques propres aux miracidiums.

En 1954 BARBOSA et COELHO (5/6), puis en 1955 SCHWETZ, BAUMANN et FORT (204) (205), rapportent encore des variations dans la susceptibilité de certains Mollusques aux miracidiums de *S. mansoni*.

Puis en 1958 KLOETZEL (146) reprend la théorie de l'attraction miracidienne due à des émissions de substances chimiques déterminant le choix des miracidiums de *S. mansoni* pour *A. glabratus*.

Si bien qu'en 1959 WRIGHT (271) peut rapporter comme encore actuelle, la phrase écrite en 1934 par WESENBERG-LUND : "Si nous essayons d'avoir quelques connaissances à partir de la littérature, sur le devenir des miracidiums, dans leurs relations avec les différentes espèces de Mollusques, il est très difficile d'avoir une idée claire des faits réels".

C'est alors que nous envisageons nos propres recherches, au moment même où paraît le travail de SUDDS (225) sur le devenir des miracidiums de certaines espèces de Bilharzies en présence d'hôtes normaux et anormaux. Ce travail concerne surtout deux schistosomes d'oiseaux, mais une courte mention est faite de l'évolution abortive de *S. mansoni* chez des hôtes non spécifiques ; et l'auteur penche pour une immunité secondaire basée sur des facteurs génétiques, avec au préalable un choix du Mollusque par les miracidiums dû au seul hasard.

En 1963 PARAENSE et CORREA (189) reprennent la thèse du rôle des facteurs génétiques dans la susceptibilité d'*A. glabratus* à *S. mansoni* en étudiant la susceptibilité d'hybrides de populations sensibles et réfractaires.

La même année MAC INNIS (165) démontre le pouvoir d'attraction miracidienne de certaines substances chimiques. En particulier des acides aromatiques à chaînes courtes.

De tous ces travaux, dont les conclusions ne sont pas toujours concordantes, il nous a cependant paru intéressant de détacher certains faits expérimentaux, que nous interpréterons quelquefois dans une ligne quelque peu différente de celle proposée par leur auteur.

Ainsi ABDEL MALEK (1) rapporte que les miracidiums de Schistosomes attaquent les coquilles vides de Planorbes et des fins graviers, aussi bien que les Mollusques vivants.

KLOETZEL (146) fait une série de constatations dans ses expériences :

a) les miracidiums continuent à se grouper dans une boîte de Petri à l'endroit où se trouvait un Mollusque réceptif, même après que l'on ait retiré ce dernier.

b) des disques de papier filtre imprégnés d'extrait de Planorbes, sont capables d'attirer les miracidiums en dehors de la présence de Mollusques vivants.

c) lorsqu'on débarrasse par un lavage à l'eau courante le Planorbe des miracidiums qui lui sont attachés (avant la complète pénétration de ceux-ci) le Mollusque ainsi lavé perd son pouvoir attractif durant quelque temps.

- Enfin, des travaux de MAC INNIS (165), nous retiendrons la possibilité pour les miracidiums de répondre à certains stimuli chimiques.

Devant ces faits confirmés par les résultats de nos propres travaux, nous avons émis l'hypothèse de substances présentes dans les tissus du Mollusque et de l'explant, probablement dans l'épithélium, capables d'"attirer" et de permettre la pénétration du miracidium ou, au contraire, incompatibles avec les propres composants du miracidium.

C'est cette substance déposée par les Mollusques à la surface des graviers ou encore contenue dans les coquilles de Planorbes vides, qui serait responsable de l'attraction observée par ABDEL MALEK, et non le hasard seul, qui guiderait les miracidiums, ainsi que le concluait l'auteur.

De même, c'est le dépôt par les Mollusques de cette substance sur les parois de verre de la boîte de Petri et son imprégnation dans le papier filtre, qui attirerait les larves dans les expériences de KLOETZEL.

En outre, le lavage du Planorbe, qui fait disparaître le pouvoir attractif, serait en faveur d'une substance présente à la surface du corps du Mollusque. Cette substance pourrait faire partie intrinsèque des tissus, ou être sécrétée.

Dans nos propres expériences, c'est la disparition progressive de ces substances des tissus de l'explant réceptif qui lui ferait

perdre ses possibilités d'infestation : au contraire, chez un explant réfractaire, la diminution du taux de ces substances dans les premiers jours suivant la mise en survie, permettrait les tentatives de pénétration, sans qu'aucun stimulus n'intervienne alors ; le seul hasard conditionnant la rencontre.

Dans l'un et l'autre cas, la dédifférenciation structurale interviendrait ensuite pour ôter toute possibilité de pénétration au miracidium.

Afin de vérifier ces hypothèses, nous avons procédé à une série d'expérimentations :

1 - Mise en survie dans une faible quantité de milieu, de plusieurs tentacules réceptifs et d'un seul non réceptif.

2 - Essais de greffe d'un tentacule réceptif et d'un non réceptif.

3 - Bain d'un tentacule non réceptif dans du mucus provenant d'un Planorbe réceptif.

4 - Addition au milieu de survie des tentacules non réceptifs, des sécrétions de Planorbes réceptifs.

5 - Addition au milieu nutritif de certaines substances adjuvantes, et tentatives secondaires d'infestation des explants ainsi traités.

RESULTATS :

I. - Pour l'expérimentation (n° 1) nous avons mis en survie dans une seule enceinte un tentacule sectionné sur un Planorbis corneus et cinq tentacules sectionnés sur des Australorbis glabratus souche Pointe à Pitre, avec seulement 3 ml de milieu.

Au bout de deux, trois, quatre jours de survie, des essais d'infestation de l'explant provenant de P. corneus ont été tentés. Tous les résultats ont été négatifs.

Il faut remarquer que, si des substances spécifiques provenant des explants réceptifs avaient diffusé dans le milieu de survie, les changements de milieux obligatoires (surtout au début de la survie), pour le maintien de celle-ci, les auraient éliminées. En outre, ces substances, si elles existent, n'ont donc pas eu la possibilité de se fixer sur les explants non réceptifs.

II. - D'autre part, et dans la même idée, des essais de greffe ou de fusion par la surface de section d'un tentacule réceptif et d'un non réceptif, ont été tentés, mais ceux-ci n'ont pas aboutis, au contraire de ce qui a pu être décrit chez les Tubes ambulacraires d'Echinides, par SCHULTZ en 1916 (201), ou par J. André THOMAS (240) dans ses cultures organo-typiques.

En ce qui concerne nos tentacules, dans un premier cas dès que la section est faite, il y a coaptation des lèvres de la plaie et l'épithélium de surface ne permet plus de suture ; ou dans l'autre cas, si l'on pratique la section de façon à avoir une plaie d'une large surface, la coaptation des bords se fait plus lentement, il y a perte de substance (type II de cicatrisation), mais les mouvements très vifs dont chaque tentacule est doué à ce moment laissent peu de place à une rencontre et un contact suffisamment long pour l'obtention d'une greffe.

III. - Dans une autre série d'expérimentations, le mucus sécrété par des Mollusques réceptifs a été recueilli et des tentacules prélevés sur des Mollusques non réceptifs baignés dans ce mucus durant trente minutes à une heure, puis immédiatement mis en contact avec des miracidiums. Dans ce cas une certaine "attraction" a pu être constatée entre l'explant et le miracidium. La larve se dirige d'une façon préférentielle vers le tentacule, tourne autour, mais aucune tentative de pénétration n'est amorcée.

IV. - Des expériences analogues ont été conduites en substituant au mucus, des extraits de Planorbes réceptifs dans lesquels l'explant était baigné de trente minutes à une heure.

Des extraits de différentes parties du Mollusque ont été préparés par broyage en solution physiologique appropriée et centrifugation. Puis les explants non réceptifs étaient plongés dans ces solutions pendant quarante cinq minutes, et ensuite mis en présence de miracidium. Ont ainsi été testés vis-à-vis de leur pouvoir d'attraction :

des extraits de tête de manteau	
" " " glande hermaphrodite	
" " " hépato-pancréas	
" " " tractus digestif	
du sang.	

Aucune tentative de pénétration n'a jamais été observée, mais une certaine attraction a pu être notée dans certains cas.

Les résultats obtenus peuvent être schématisés dans le tableau suivant :

(voir page suivante).

Extraits de Mollusques réceptifs	Attraction contact	Pénétration
Tête et manteau	+++	0
Tractus digestif	0	0
Hépatopancréas	±	0
Glande hermaphrodite	0	0
Sang	0	0
Mucus	+	0

V. - Dans une dernière série d'expérimentations, nous nous sommes proposés d'étudier le rôle possible de certaines substances adjuvantes sur les phénomènes d'attraction et de pénétration.

La théorie selon laquelle les miracidiums seraient attirés par les Planorbes, grâce à des substances chimiques, a en effet été soutenue par de nombreux auteurs, et tout récemment des expériences à base d'attractifs chimiques incorporés à de la gélose ont été reprises avec des résultats positifs par MAC INNIS en 1963 (165).

Pour notre expérimentation ces substances étaient additionnées au milieu de survie dans des proportions allant de $5,5 \times 10^{-3}$ à $5,5 \times 10^{-4}$ M selon la toxicité des produits vis-à-vis de nos explants.

Les explants non réceptifs étaient baignés dans ces solutions durant quarante cinq minutes à un jour, puis l'infestation était immédiatement tentée.

Les substances testées furent

1°/ des acides à chaînes courtes :

acide glutamique
 " valérique
 " butyrique
 " sialique (n acetyl neuraminic)
 " propionique
 acide glycuronique et acide galacturonique

2°/ des substances chimiques :

extraits de levure
 glucose
 galactose
 mannose

carnithine
glycogène

3°/ Certains acides aminés présents dans le milieu intérieur des Planorbes :

tryptophane
méthionine
alanine
lysine
arginine
histidine
acide aspartique
glycine
proline
thréonine
leucine

4°/ Des substances capables d'abaisser les barrières tissulaires :

hyaluronidase
cortisone

RESULTATS :

1) Aucune différence dans les réponses n'a pu être décelée quant à l'influence du facteur temps de contact entre l'explant et les solutions étudiées.

2) Les substances ayant donné les résultats positifs ont été groupées dans le tableau ci-dessous :

Substances additionnées au milieu	Attraction	Essais de pénétration	Pénétration accomplie
Acide propionique	++	+	0
Acide aspartique	++	+	0
Acide sialique	++	+	0
Acide glutamique	+	+	0
Glucose	+	0	0

Avec toutes les autres substances, les résultats ont été négatifs.

Devant les résultats de ces expériences, s'est confirmée l'hypothèse de la présence dans les tissus de revêtement des Mollusques, de substances diffusibles dans le milieu et responsables de l'attraction miracidienne.

L'hypothèse de la présence de substances spécifiques de nature inconnue dans le mucus de certains Mollusques voisins des Planorbes (Lymnées) avait déjà été faite par WRIGHT en 1959, (270) qui cherchait alors à préciser la taxonomie du genre Lymnae par l'étude des différences obtenues dans l'analyse chromatographique du mucus de diverses espèces.

Cependant, peu d'analyses biochimiques des substances mucoïdes de Mollusques ont été entreprises ; HAMMARSTEN dès 1885 (120), puis LEVENE en 1925 (159), avaient signalé la présence de deux types différents de carbohydrates liés aux protéines chez Helix. Les uns obtenus à partir du mucus et du pied, les autres provenant du corps de Mollusques. L'hydrolyse de ces composés n'aboutit pas aux mêmes substances. Elle donne pour les premiers : acide sulfurique, chitosamine et un acide gras volatil ; pour les seconds, constitué par ce que les auteurs appellent la "gomme animale", principalement des polygalactoses.

Des auteurs japonais, MASAMUNE et coll. en 1947 et 1950 (170) (171) dans leur étude générale sur la biochimie des carbohydrates, démontrent la présence d'acide mucoïtine sulfurique, dans le mucus des Helix et obtiennent par hydrolyse acide des composés différents, s'ils s'adressent à la mucine du pied ou à la mucine du mucus. Dans le mucus ils mettent en évidence de la glucosamine et du galactose, et dans la mucine du pied, de la glucosamine, du mannose et de l'acide galacturonique.

Aucune analyse de ce genre n'a été faite pour les Planorbes. Les difficultés techniques de l'obtention du mucus en quantité suffisante sont peut être à la base de cette lacune. Les auteurs qui ont étudié la spécificité des Planorbes par des méthodes chromatographiques, l'ont fait sur de l'hémolymphe ou des extraits totaux des tissus (TARGET (226 à 228), DUSANIC (80)). Les résultats de telles chromatographies ne peuvent éclaircir notre problème ; en effet, dans notre hypothèse, les substances responsables de l'attraction miracidienne doivent être contenues, soit dans le mucus, soit dans les produits de sécrétions de l'épithélium de revêtement.

On peut envisager en effet, par analogie avec ce qui se passe chez Helix, que les mucoprotéines du mucus, des sécrétions de l'épithélium et des tissus internes des Planorbes, sont de compositions différentes.

Nous devons donc mettre en évidence une sécrétion éventuelle de l'épithélium de surface, et en étudier le pouvoir attractif.

CHAPITRE II.

RECHERCHES RELATIVES A DES SUBSTANCES
SECRETEES PAR L'EPITHELIUM.

I° - Mise en évidence des substances sécrétées par l'épithélium de surface des tentacules.

Pour confirmer l'existence de sécrétions de l'épithélium de surface et mettre en évidence les substances ainsi sécrétées, nous avons eu recours à des colorations histochimiques.

Méthode :

Pour ce faire nous avons utilisé la coloration P. A. S. SCHIFF procédé MAC MANUS. Cette coloration histologique caractérise les aldéhydes qui apparaissent en rose violet lorsqu'ils sont en contact avec de la fuchsine décolorée par l'anhydride sulfureux. En présence de polysaccharides, l'acide périodique crée des groupements aldéhydiques et la mise en évidence est aisée.

Cette réaction colore les substances qui contiennent les groupements 1 - 2 glycols CHOH-CHOH ou CHOH-CO , c'est-à-dire les polysaccharides, les glycoprotéines, les mucoprotéines, la mucine et le glycogène ; les sucres libres donnent des résultats négatifs. Une action diastasique (ptyaline ou maltase) permet de différencier le glycogène des polysaccharides et des glycoprotéines. L'intensité de la coloration permet enfin une évaluation quantitative.

Technique expérimentale :

Des tentacules fraîchement sectionnés ou mis en survie depuis des temps variables, sont fixés, coupés et colorés au P. A. S.

RESULTATS :

Dans des tentacules fraîchement sectionnés ou en survie depuis deux à trois jours, il s'est révélé le long de l'épithélium une bande rose caractéristique des polysaccharides. (Pl. XV fig. 61 et 64).

Dans des tentacules ainsi colorés au P. A. S. , les fibres musculaires sont également colorées en rose-violet.

Afin de différencier les sécrétions de l'épithélium et de ne conserver pour la poursuite de nos expériences que ces dernières, nous faisons agir sur nos explants avant coloration une diastase (maltase à 2 %). L'action de cette dernière fait disparaître la coloration due au glycogène et seule la bande rose bordant l'épithélium est conservée (fig. 61. Pl. XV).

Le mucus qui recouvre le corps de nos explants est éliminé par un lavage avant fixation et inclusion, la sécrétion des glandes à mucus est également stoppée lors de la fixation.

D'autre part, une coloration au P. A. S. est faite sur des tentacules infestés, maintenus en survie. Dans ce cas, la coloration fait apparaître la présence d'une substance P. A. S. + (rose) dans les sporocystes. Cette substance n'est pas détruite par action de la diastase. (Pl. XV fig. 64).

II° - Devenir des substances sécrétées au cours de la survie de l'explant.

a) Des colorations au P. A. S. , après fixation et coupes, ont été pratiquées sur des tentacules en survie depuis des temps variés : (Pl. XV).

2 - 8 - 10 - 15 - 21 jours.

Dans un tentacule en survie depuis un jour, si on ne pratique pas un lavage préalable à la fixation, le mucus demeure à la surface de l'explant et colore celui-ci en rose-violet sous l'action du P. A. S.

Dans un tentacule en survie depuis deux jours, le mucus superficiel a déjà disparu et la coloration au P. A. S. ne fait apparaître que la bande rose de sécrétion le long de l'épithélium. (Pl. XV fig. 61).

Dans un tentacule en survie depuis une semaine, les sécrétions du mucus ont totalement disparu, la bande rose bordant l'épithélium s'atténue, la coloration au P. A. S. est plus faible. (Pl. XV fig. 64). Il y a donc une sécrétion de l'épithélium de surface, indépendante de la sécrétion du mucus, qui pourrait expliquer l'attraction élective de certaines parties du corps du Planorbe.

Dans un tentacule en survie depuis quinze jours, la sécrétion épithéliale a pratiquement disparu, et dans l'explant en survie depuis trois semaines où l'organisation en sphère est bien établie, il n'y a plus trace du tout de sécrétion épithéliale (Pl XV fig. 65).

Cependant la survie en milieu liquide renouvelé ne nous permet pas de contrôler la sécrétion dans le milieu externe. Nous ne pouvons que mettre en évidence la disparition progressive des substances à P. A. S. + du bord externe de l'épithélium du tentacule en survie.

b) Afin de vérifier la présence de cette sécrétion dans le milieu environnant, nous avons tenté des survies de nos explants sur support solide. Mais ce support ne devait contenir aucune substance capable de donner une réaction positive à la coloration P. A. S.

Ainsi donc, nous avons préparé de la gélose à 1 % dans la solution physiologique isotonique au milieu intérieur des Planorbes. Cette gélose était stérilisée à l'autoclave, puis répartie dans des salières. Des tentacules fraîchement sectionnés étaient disposés à la surface de la gélose solidifiée dans chaque salière, et celle-ci couverte d'un verre de montre luté à la paraffine.

Les tentacules soumis à de telles conditions expérimentales ne survivent que quelques jours, trois ou quatre maximum, mais ce court laps de temps suffit pour permettre aux substances étudiées de diffuser dans la gélose.

Au bout de deux jours, le verre de montre est oté, l'explant retiré, et les blocs de gélose colorés par la technique du P. A. S. La vitalité du tentacule après cette survie sur gélose est vérifiée en le remplaçant dans le milieu nutritif liquide, où l'on constate la persistance de mouvements musculaires, mais les battements ciliaires sont diminués du fait du séjour sur la gélose.

Une remarque technique s'impose ici. Les plaques de gélose traitées par l'acide périodique, puis lavées soigneusement, étaient colorées par le réactif de Schiff, puis par l'acide sulfureux. La lecture de la coloration (0, +, ++, +++) (fig. 66 pl. XV) s'effectuait alors à ce stade et, immédiatement, sans lavage ; la fuschine ayant tendance à se recolorer ultérieurement. Toute lame non évaluée dans les quinze minutes qui suivaient le troisième bain d'acide sulfureux était considérée comme non valable ; des essais de dessèchement de la gélose avant coloration se sont révélés impropres.

Suivant cette technique une série de coloration par le P. A. S. ont ainsi été faites :

1) Blocs de gélose à 1 % dans la solution minérale équilibrée seule ; blocs de gélose à 1 % dans la solution nutritive complète sur

lesquels un tentacule avait été mis en survie deux jours ; comparaison avec blocs de gélose qui n'avaient pas reçu d'explants.

2) Blocs de gélose à 1 % sur lesquels des Planorbes vivants avaient été placés une demi-heure, et avaient pu déposer leur mucus et le produit de leurs sécrétions - blocs de gélose témoins.

3) Blocs de gélose sur lesquels on avait placé pendant une heure des extraits tissulaires de Planorbes fraîchement préparés (extraits totaux de Planorbes moins l'hépatopancréas, la glande hermaphrodite et le tractus digestif).

Les colorations par le P. A. S. de tous ces blocs de gélose ont donné des résultats positifs : les témoins gélose pure ayant tous été négatifs dans les conditions expérimentales données ci-dessus. Seuls les blocs de gélose contenant le milieu nutritif total ont donné des réactions douteuses. Dans la suite de l'expérimentation, la gélose a toujours été préparée avec la solution minérale équilibrée seule.

Chaque plaque de gélose ayant reçu des sécrétions, soit de Planorbes entiers, soit d'explants, était fortement colorée en rouge. L'intensité de coloration variant selon le temps de contact entre la gélose et les tissus (Pl XV fig. 66).

Les substances donnant une coloration P. A. S. + diffusent donc dans le milieu.

III° - Essais d'extraction des substances en cause.

Nous aurions désiré réaliser l'extraction chimique des substances sécrétées par l'épithélium afin d'étudier plus facilement leur rôle dans la spécificité parasitaire.

Des tentatives d'extraction chimique suivies d'hydrolyse acide se sont révélées difficiles à réussir dans de bonnes conditions.

En effet, si l'on s'adresse aux explants, on obtient une quantité très faible de substance. D'autre part, chez le Mollusque, les produits ainsi extraits n'étaient pas obligatoirement et uniquement des substances sécrétées par l'épithélium.

Par des colorations différentielles chez le Mollusque entier, il a été établi que : outre l'épithélium de surface, des polysaccharides (probablement du glycogène, car il est digestible par une diastase) se trouvent en abondance dans les muscles du pied, dans la région de la tête et autour de la radula du Mollusque.

Entre les fibres musculaires on trouve des granules de polysaccharides répartis dans le tissu conjonctif. La glande du tractus digestif contient aussi du glycogène en quantité variable.

Dans la glande hermaphrodite il y a une grosse proportion de polysaccharides dans les ovules en développement en particulier ; dans les épithéliums du poumon et des reins, le taux en est variable suivant les espèces.

La glande de l'albumine a une réaction très positive au Schiff, elle est remplie de substances non digestibles par la diastase. C'est sans doute du galactogène à l'exemple de l'Helix.

Donc dans les conditions les plus favorables, où l'on ne traite que le pied et la tête du Mollusque, l'extraction acide ne nous a pas parue satisfaisante.

Nous avons donc entrepris d'étudier le rôle de ces substances dans la spécificité parasitaire par un moyen différent de l'extraction chimique.

CHAPITRE III.

RECHERCHES RELATIVES AU RÔLE
DES SUBSTANCES EN CAUSE DANS LA
SPECIFICITE DE L'ATTRACTION MIRACIDIENNE.

I. - Essais expérimentaux d'attraction miracidienne.

1) Sur des séries de paires de tentacules mises en survie le même jour et appartenant au même individu, nous avons pratiqué, à intervalles réguliers et simultanément : chez l'un une coloration P. A. S. après fixation et coupe, chez l'autre un test d'attraction miracidienne.

Les expériences ont révélé que :

a - la perte du pouvoir d'attraction était corrélative de la disparition de la sécrétion de la substance P. A. S. + par l'épithélium de l'explant,

b - la présence ou l'absence de mucus superficiel ne paraît pas avoir d'effet sur les tentatives de pénétration dans les explants,

c) chez des tentacules en survie appartenant à une souche non susceptible à *Schistosoma mansoni* (P. corneus), c'est au moment où la sécrétion de cette substance décroît que les rares tentatives de pénétration des miracidiums ont été notées.

2) Dans une autre série d'expériences, des blocs de gélose ayant reçu les sécrétions des Planorbes ou des explants (comme il a été décrit dans le chapitre précédent) ont été mis en présence de miracidiums pour tester leur pouvoir d'attraction.

Des blocs de gélose témoins ont été testés parallèlement ; ceux-ci étaient constitués par de la gélose dissoute dans des solutions diverses. Les résultats obtenus peuvent être résumés dans le tableau ci-après.

	Attraction	Contact	Pénétration
Gélose en eau distillée	0	0	0
Gélose + solution p seule	0	0	0
" + sol. p + gluconate	0	0	0
" + " p + sol. nutritive complète	0	0	0
Gélose + acide propionique	+++	+++	±
Gélose + acide galacturonique	+	±	0
Gélose + sécrétion Planorbes entiers	+++	+++	±
Gélose + sécrétion de l'explant	+++	++	0
Gélose + extrait tissulaire	++	++	0
Gélose + glucosamine + galactose	0	0	0

Conclusions des expériences préliminaires.

Des résultats de ces expériences nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

a) Nous savons déjà grâce à la coloration P. A. S. , que ces substances à caractères chimiques encore non définis, sont des corps capables de libérer des aldéhydes.

b) Ces substances mises en évidence par la coloration P. A. S. sont localisées dans l'épithélium de revêtement et leur disparition au cours de la survie est corrélative de la perte du pouvoir d'attraction et par là, d'infestation.

c) La substance responsable du pouvoir d'attraction d'un explant ou même d'un Mollusque entier vivant, peut être retirée par lavage des tissus dans une solution d'alcool éthylique diluée ; si les tissus n'ont pas été lésés, cette perte n'est pas irréversible et le pouvoir d'attraction peut réapparaître au bout de quelques heures.

d) Certaines substances chimiques peuvent donner lieu à une attraction, mais les constituants du milieu de survie n'interviennent pas dans ces phénomènes.

e) L'attraction la plus spectaculaire est toujours observée avec des extraits musculaires de Planorbes.

Devant ces résultats s'est renforcée notre conviction du rôle de substances à caractère mucopolysaccharidique ou glycoprotéique sécrétées par l'épithélium de revêtement des Mollusques dans l'attraction miracidienne.

Les tentatives d'extraction de cette substance s'étant révélées infructueuses (cf chapitre précédent), nous avons alors abordé le problème par la proposition inverse.

Si le traitement par une diastase, détruisant spécifiquement les substances sécrétées, faisait du même coup perdre aux explants leur pouvoir attractif, il serait probable que les substances responsables de cette action fussent des mucopolysaccharides sécrétés par l'épithélium.

Pour cette série d'expérimentations nous avons utilisé une mucopolysaccharidase, la thiomucase. Cette enzyme, voisine mais différente, de l'hyaluronidase, a le pouvoir de dépolymériser l'acide chondroïtine sulfurique et par là, d'éliminer les mucopolysaccharides des tissus (CASTAIGNE 1959) (37). Son action sur les explants ou les tissus de Mollusques doit donc, si les mucopolysaccharides sont responsables de l'attraction miracidienne, faire disparaître le pouvoir attractif.

II. - Action de la Thiomucase.

1) Essais préliminaires

Avant toute expérimentation sur les explants, des essais préliminaires furent effectués, tout d'abord chez des Planorbes entiers vivants, pour déterminer la toxicité éventuelle de l'enzyme.

La thiomucase utilisée était celle commercialisée sous forme lyophilisée. Des dilutions croissantes étaient faites à partir d'une solution contenant cinquante unités par ml, dans la solution physiologique équilibrée. Chaque Mollusque était plongé une demi-heure dans les différentes solutions. Les résultats peuvent se schématiser comme suit :

Thiomucase unité par ml	Vitalité des Planorbes
50	±
25	+
12,5	+++
6,25	+++
2,50	+++
1,25	+++
0,5	+++
0,25	+++

L'enzyme semble donc doué d'un très faible pouvoir toxique vis-à-vis des Planorbes ; la seule réaction manifestée par ceux-ci est une extension marquée. Le contact avec la thiomucase, surtout à des doses fortes, les fait sortir de leur coquille.

2) Action de l'enzyme sur les explants en survie.

L'action de l'enzyme a été ensuite testée vis-à-vis des tentacules explantés.

Des doses croissantes ont été essayées. La durée du bain des explants dans les différentes solutions a été fixée à quinze minutes. La vitalité des tentacules a été contrôlée sous la loupe bino-culaire et l'intégrité des tissus vérifiée par une coloration à l'hé-malum-éosine après fixation et coupes.

Thiomucase unité par ml	Vitalité de l'explant	Intégrité des tissus après hémalum-éosine
6, 25	! +	±
2, 50	+ + +	+
1, 25	+ + +	+ + +
0, 5	+ + +	+ + +

A des doses en dessous de 2 U/ml, l'organisation tissulaire n'est pas touchée. La dose de thiomucase à utiliser sans dommage pour les tissus internes a donc été fixée entre 1 U/ml et 1, 50 U/ml.

Des tentacules ont ainsi été traités par des solutions de thio-mucase contenant 1, 25 U/ml, pendant quinze minutes aux différents stades de la survie : dès la section, premier, deuxième, troisième jour de survie ; c'est-à-dire tant que la quantité de mucopolysaccha-jour de survie ; c'est-à-dire tant que la quantité de mucopolysaccha-rides sécrétées par l'épithélium est encore notable (vérifiée par colo-ration P. A. S. , voir chapitre précédent). Puis ces tentacules sont :

a) soit fixés, coupés et colorés par le P. A. S. , dès qu'ils sor-tent du bain de thiomucase.

b) soit déposés à la surface de petits cubes de gélose pendant un temps variable entre cinq minutes et deux jours.

Dans le cas des explants fixés et colorés, quelque soit la durée de survie (trois jours maximum) avant le traitement par l'enzyme, la coloration P. A. S. ne met plus en évidence aucune sécrétion de muco-polysaccharides. Tout le tentacule est de couleur uniforme (vert) sans aucune trace rose ou violette (Pl XV fig. 62). Une coloration à l'héma-lum-éosine, faite sur une coupe de la même série, permet de vérifier l'intégrité des tissus.

Donc la thiomucase utilisée à cette dose fait disparaître les mucopolysaccharides des tissus, sans lésions sur l'organisation interne de ceux-ci.

Dans le cas des explants déposés sur gélose : les résultats dépendent du temps pendant lequel le tentacule reste en contact avec la gélose.

Temps de réapparition de la sécrétion.

Temps de contact tentacule gélose après thiomucase	Coloration gélose P. A. S.
5 minutes	0
15 "	+ très facile
1/2 heure	+ (faible)
1 "	+
12 "	+++
24 "	+++
48 "	+++

La réapparition de la sécrétion après action de la thiomucase dans les tentacules en explant est progressive et se situe entre une demi-heure et deux heures.

Ce temps de réapparition de la sécrétion est confirmé par des colorations histologiques. (Pl. XV fig. 63)

Des tentacules après traitement par l'enzyme sont mis en survie dans le milieu nutritif complet, puis fixés, coupés, colorés au P. A. S. à des intervalles de une heure, deux heures, cinq heures, douze heures, vingt quatre heures.

La coloration du bord libre de l'épithélium peut s'évaluer ainsi :

1 heure	+ très faible
2 "	+
5 "	++
12 "	+++
24 "	+++

Nous avons donc ainsi une preuve supplémentaire qu'à ce taux, l'action de la thiomucase n'est ni toxique, ni irréversible; les mucopolysaccharides sont éliminés sans que les cellules les sécrétant soient lésées.

3) Action de l'enzyme sur les sécrétions des Mollusques vivants.

Réciproquement, l'action de la thiomucase a été testée sur des Planorbes entiers.

Ceux-ci sont immergés pendant trente minutes dans une solution de thiomucase à des doses croissantes puis déposés à la surface d'une lame de gélose et des colorations P. A. S. effectuées sur la gélose :

Taux de thiomucase	Durée, contact avec gélose	P. A. S.
12, 5	(10'	±
	(30'	++
6, 25	(10'	+
	(30'	+++
2, 50	(10'	++
	(30'	+++
1, 25	(10'	+++
	(30'	+++

Ainsi les sécrétions (mucus ou polysaccharides de l'épithélium) semblent reprendre très vite après le traitement par la thiomucase chez le Mollusque vivant. C'est sans doute la sécrétion du mucus qui reprend la plus vite et redonne un P. A. S. positif dans un laps de temps très court.

Au contraire chez l'explant la reprise de la sécrétion est plus lente, l'action de l'enzyme à des doses moindres est plus profonde et plus durable. Le test de la disparition de l'attraction miracidienne corrélative de la disparition des sécrétions peut donc seulement s'effectuer d'une façon valable chez les explants et le temps de contact favorable sera de quinze minutes.

4) Action de l'enzyme sur les broyats musculaires.

L'action de la thiomucase a également été testée vis-à-vis d'extraits musculaires de Planorbes. Des fragments musculaires (pied et tête) fraîchement prélevés et écrasés, sont plongés dans

des solutions d'enzyme à 2, 5 U/ml, puis disposés sur des blocs de gélose pendant une demi-heure, et ceux-ci colorés ensuite au P. A. S.

Les colorations ont toujours été négatives, au contraire de l'obtention d'une coloration + + + avant traitement par l'enzyme (voir chapitre précédent).

5) Action de l'enzyme sur les produits excrétés par les tissus des Planorbes.

Enfin l'action de la thiomucase a été essayée sur les cubes de gélose imprégnés par des sécrétions soit des Planorbes entiers, soit des tentacules en survie.

Les conditions d'expériences étaient les mêmes que lors de l'étude qualitative des sécrétions épithéliales (voir chapitre précédent), mais avant la coloration au P. A. S. les blocs de gélose étaient soumis à l'action de l'enzyme.

Les doses utilisées varièrent de 1, 25 à 6 U/ml, mais sans résultats concluants. Si les colorations des blocs étaient très faibles après traitement par l'enzyme, celles-ci ne se sont jamais complètement négativées à l'encontre des témoins. L'enzyme semble donc ne pas pouvoir agir sur les substances diffusées au sein même de la gélose.

III - Devenir de l'attraction miracidienne après action de la thiomucase sur les sécrétions de l'épithélium.

Devant ces constatations, nous avons envisagé une autre série d'expériences, afin de vérifier le rôle des sécrétions épithéliales dans l'attraction miracidienne.

1) Des paires de tentacules prélevés chez le même individu, ont été mises en survie pendant une journée et demie, afin d'éliminer le mucus superficiel ; puis un tentacule seulement a été traité pendant quinze minutes par une solution de thiomucase contenant 1, 25 U/ml, et les deux mis en présence de miracidiums de la souche homologue.

Les phénomènes d'attraction comparative ont été suivis à la loupe binoculaire pendant une heure.

2) La même expérimentation a été faite avec deux Planorbes entiers vivants, du même âge, appartenant à une souche très réceptive. L'un était traité par une solution de thiomucase contenant 2, 50 U/ml, l'autre était conservé intact, et leur pouvoir d'attirer les miracidiums comparés.

3) Malgré les résultats douteux obtenus par action de solutions de thiomucase sur des blocs de gélose imprégnés de sécrétions, nous avons cependant testé le pouvoir d'attraction de tels blocs de gélose traités par l'enzyme.

Ainsi les tentacules étaient mis en survie sur des blocs de gélose dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment, puis retirés. Les blocs de gélose étaient ensuite soumis à l'action de la thiomucase et leur pouvoir d'attraction vis-à-vis des miracidiums testés.

4) Enfin une contre épreuve a été faite sur des tentacules ayant perdu leur pouvoir d'attraction sous l'action de la thiomucase. De tels tentacules étaient remis en survie dans le milieu complet pendant vingt quatre heures ; puis après ce laps de temps, mis en présence des miracidiums et leur pouvoir d'attraction testé.

Nous avons vu que ce laps de temps (vingt quatre heures) était largement suffisant pour la réapparition des sécrétions de l'épithélium (cf ch. III).

Les résultats obtenus peuvent se schématiser dans le tableau suivant :

	Attraction	Contact	Pénétration
Tentacule sain	+++	+++	+++
Tentacule traité par l'enzyme	0	0	0
Tentacule traité et remis en survie 24 h.	++	+	0
Planorbe sain	+++	+++	+++
Planorbe traité par l'enzyme	0	0	0
Gélose ayant reçu les sécrétions des tentacules	++	++	0
Même gélose traitée par l'enzyme	±	0	0

CONCLUSION :

Ainsi donc, il apparaît bien que des substances à caractère mucopolysaccharidique, sécrétées par l'épithélium de revêtement

des Planorbes ont une part importante dans les phénomènes d'attraction miracidienne. La disparition de cette sécrétion est corrélative de la perte du pouvoir attractif des tentacules. La reprise de celle-ci coïncide avec un retour attractif du miracidium vers les tissus du Mollusque.

DISCUSSIONS GENERALES

Arrivés au terme de cette étude expérimentale, il nous paraît nécessaire d'en reprendre les principaux résultats pour les confronter avec ceux obtenus par d'autres chercheurs, travaillant dans des domaines ou sur du matériel voisin et d'essayer d'en dégager des conclusions pratiques.

Pour des raisons d'ordre et de clarté, nous diviserons la discussion en trois chapitres :

- A - La méthode de survie - le milieu - les conditions de survie.
- B - Les phénomènes relatifs à la survie de l'explant, la différenciation.
- C - Le parasitisme - L'évolution du parasite dans l'explant - la spécificité du choix du Mollusque par le Miracidium.

A - La méthode de survie, le milieu, les conditions de survie.

Pour son maintien en survie in vitro chaque objet a ses problèmes propres, quant aux conditions optima de survie et à la composition idéale du milieu. De ce fait, il est toujours nécessaire d'adapter la méthode de base choisie.

En ce qui concerne le présent travail, notre problème se posait sous la forme du maintien en survie d'explants de Planorbes pendant un temps suffisamment long pour permettre une étude parasitologique ultérieure ; nous avons donc adopté les principes de base de la méthode de culture organo-typique de J. André THOMAS (239), et tout en lui conservant sa simplicité, nous avons été amenés à lui adjoindre certains détails techniques des procédés actuels de la culture des tissus pour répondre aux besoins de nos explants.

Ainsi le principe des trois solutions de base : solution physiologique équilibrée, solution nutritive, antibactériens, a été maintenu en mettant l'accent sur la concordance entre la composition ionique de la solution physiologique et celle du milieu interne des Planorbes et en apportant des substances particulièrement nécessaires aux besoins propres de nos tentacules en survie.

En outre, nous avons insisté sur la désinfection préalable des Mollusques, fournisseurs d'explants, et sur l'adjonction au milieu d'antibiotiques compatibles avec le maintien de leur intégrité tissulaire.

Enfin, une légère modification technique a été apportée en utilisant des tubes à culture de tissus bouchés au caoutchouc gris, au lieu de boîtes de Petri, cette enceinte de survie permettant le maintien du pH dans des limites plus étroites.

En ce qui concerne le milieu de survie, les solutions proposées par les auteurs au moment de la mise en route de ce travail, nous ont paru peu compatibles avec les exigences des tissus de nos Mollusques.

En effet, spécialement chez les Invertébrés, les milieux internes et les biotopes varient beaucoup d'une espèce à l'autre, de plus, nous avions affaire à des Mollusques aquatiques non marins, et le milieu de survie idéal, constitué par de l'eau de mer, ne pouvait pas être utilisé.

Le milieu de survie optimum doit être celui qui se rapproche le plus du milieu interne de l'objet biologique étudié. C'est pourquoi nous avons établi la composition de notre solution saline d'après l'analyse de la teneur en ions de l'hémolymphe des Planorbes.

Certains apports supplémentaires ont été envisagés : Ca et K par exemple, car nous nous adressions à des explants doués de mouvements musculaires. Puis des éléments nutritifs sélectionnés sont venus compléter ce milieu, où, si les échanges se révélaient bons, la survie par imbibition devait se poursuivre aisément.

Nous avons résumé la composition des différentes solutions salines proposées par les auteurs pour la survie de tissus de Mollusques dans le tableau n° 4.

Nous y avons ajouté, pour comparaison, les solutions proposées par CHERNIN (44) et par FLANDRE et VAGO en 1963 (93) bien que ces dernières aient été publiées deux ans après la mise au point de notre propre milieu de survie.

De l'étude de ce tableau, il ressort que jusqu'en 1961, aucune de ces solutions n'était calculée à partir de la composition ionique du

Tableau n° 4.

108 bis

Auteurs	HEDON et FLEIG modifié par HILL et BOHUSLAV	Ecole de WOLFF TYRODE HOLTFFRETER GEY			J. A. THOMAS	FRASER	CHERNIN	VAGO	MICHELSON	RIPPLINGER	BENEX	CHERNIN	FLANDRE et VAGO
Années	1903 / 1933	1910	1931	1945	1941	1946	1957	1958	1959	1961	1961	1963	1963
Matériel	Explant Helix	Cultures organo-typiques sur support gélose - organes d'invertébrés (1961).			Survies organo-ty- piques en milieu liquide; organes d'invertébrés	Etudes embryolo- giques Lymnés.	Elevage aseptique Planorbes.	Cultures de tissus de Gastéropodes	Elevage aseptique Mollusques Prosobranch- tes	Coeur d'Helix hémolymphé hiver.	Survies Explant A. glabra- tus	Cultures après try- pisation de Coeur A. glabra- tus	Cultures de tissus de Helix Helix
NaCl	7,4	8	3,50	8,00	5,35 ms. variable	2,00	2,00	6,5	1,53	4,27	3,25	2,80	0,072
K Cl	0,42	0,20	0,05	0,38	-	-	0,10	0,14	0,15	0,30	0,25	0,15	0,004
CaCl ₂	0,48	0,20	-	0,27	-	0,3	0,10	0,12	0,20	1,10	-	0,53 à 0,75	0,003
Gluconate de Ca	-	-	-	-	0,50	-	-	-	-	-	2,40	-	-
Mg Cl ₂	-	0,10	-	0,21	-	0,3	-	-	0,10	-	-	-	-
Mg SO ₄	-	-	-	-	0,15	-	0,2	-	-	-	0,08	0,45	0,002
NaH CO ₃	0,10	1,00	0,20	0,25	-	2,0	facultatif à 2 ml d'une sol à 1,4%	0,20	-	-	0,20	0,05	0,055
Na ₂ H PO ₄	-	-	-	0,15	0,90	-	0,05	-	0,09	-	0,10	0,07	-
K H ₂ PO ₄	q s pr pH	-	-	0,025	0,10	0,1	-	-	-	-	0,02	-	-
Na H ₂ PO ₄	-	0,05	-	-	-	-	-	0,01	-	-	-	1,00 + tréhalose	0,002
Glucose	2,00	1,00	-	2,00	-	-	0,5	1,00	-	-	1,00	1,00	0,50
pH	6,8	instable	-	7,4	7,4	7,8 du CaCO ₃	7,2/7,4	7,6/7,9	-	-	7,6	7,5	7,6

milieu interne des espèces de Mollusques utilisés. Les solutions de HEDON, FLEIG, TYRODE, GEY sont des solutions salines équilibrées pour les tissus de Vertébrés. Même si elles sont légèrement modifiées lors de certaines expérimentations, elles ne s'appuient sur aucune correspondance ionique précise avec le milieu interne des objets explantés. En général, elles se révèlent trop concentrées en ions pour les tissus de nos Planorbes.

Cette remarque s'applique également à la solution proposée en 1958 par VAGO (248) pour des cultures de tissus de Gastéropodes.

La solution d'HOLFRETER est déjà meilleure, mais ne peut convenir indifféremment à tous les Invertébrés et manque de certains ions primordiaux.

J. A. THOMAS en 1941 (231), le premier, propose une solution dont la composition peut varier selon les organismes considérés, mais ne l'applique pas à des tissus de Mollusques dulcicoles.

FRASER, en 1946 (99), propose bien une solution qu'il dit similaire au milieu interne des Lymnées, mais sans précisions, et, pour son utilisation dans nos propres expériences, il n'est pas prouvé que la composition du milieu interne de Planorbes soit identique à celle des Lymnées. Enfin, cette solution est de par sa composition, très instable, car très peu tamponnée.

CHERNIN, en 1957, (41) lorsqu'il tente un élevage de Planorbes en milieu aseptique, se contente d'utiliser comme solution stérile, celle proposée par FRASER et expérimentée par CARRIKER (36) avec de très légères modifications.

MICHELSON, en 1959 (174), reprend aussi ces solutions pour l'élevage en milieu stérile de Mollusques Prosobranches, sans chercher, lui non plus, à établir des bases analytiques.

La solution proposée par RIPPLINGER en 1961 (196) et utilisée par la suite par GOMOT et GUYARD en 1963 (112-118) pour l'étude de la gonade juvénile d'*Helix aspersa*, est la seule à être basée sur la détermination de la teneur en ions de l'hémolymphe d'Escargot. Malheureusement, cette composition est très variable selon qu'on la détermine en période sèche ou humide, et cet auteur démontre que ces solutions utilisées sur des coeurs en survie, peuvent être très bénéfiques ou très toxiques selon la saison. En outre, le milieu interne des Planorbes doit être, du fait de leur biotope, très différent de celui des *Helix*, et cette solution ne peut convenir aux explants mis en survie au cours de notre propre expérimentation.

En 1963 (deux ans après la publication de la composition de notre milieu de survie) CHERNIN (44) propose une nouvelle solution

assez différente de sa première, pour la culture de coeur d'A. glabratus après trypsinisation. Cette fois, cet auteur prend pour base la teneur en ions de l'hémolymph de Planorbes. Les chiffres qu'il obtient lors de cette détermination diffèrent quelque peu de ceux obtenus par les auteurs précédents (FLORKIN (97) MAGALHAES (167) (168)), à partir desquels nous avons réalisé notre milieu de survie. (Voir tableau p. 43). Il faut sans doute en conclure que comme les autres Gastéropodes, la teneur en ions de l'hémolymph des Planorbes peut varier selon la concentration en électrolytes du milieu environnant. C'est pourquoi, avant de tenter la survie de nos explants, nous avons vérifié l'équivalence du Δ^o de notre solution et celui du milieu intérieur des Planorbes utilisés pour prélever les explants.

Outre les variations dues à la composition différente de l'hémolymph de ses Planorbes, CHERNIN apporte le calcium de son milieu par adjonction de CaCl_2 . Pour notre part, nous avons préféré le gluconate qui nous a paru plus satisfaisant et plus assimilable. La meilleure utilisation du gluconate par rapport au chlorure avait déjà été signalée par J. André THOMAS et Isabelle BORDERIOUX (242) dans leur travail sur les Urodèles en 1948. D'autre part l'utilisation du gluconate évite l'introduction de l'ion Cl dans notre milieu, où il se trouvait déjà en excès selon les données de FLORKIN.

Enfin, la faible teneur en phosphore trouvé par CHERNIN dans l'hémolymph l'amène à additionner sa solution de très peu de phosphates, et comme, d'autre part, la quantité de bicarbonate qu'il introduit dans son milieu est également très faible, il nous paraît que sa solution doit être très peu tamponnée. Mais aucune mention n'est faite à ce sujet par l'auteur.

Outre son rôle dans le système tampon, nous avons été également amenés à ajouter du bicarbonate dans notre solution en nous référant au travail de DUVAL en 1928 (81) qui, se basant sur le Δ^o cryoscopique du milieu interne de Planorbes, trouve que la concentration ionique attribuable aux carbonates peut atteindre 59 % dans l'hémolymph de ces Mollusques. Ce qui, d'autre part, nous permet de ne pas nous inquiéter de la transformation possible du bicarbonate en carbonate dans notre solution au cours de la survie ; le pH de nos solutions se maintenant suffisamment stable.

Si on considère les chiffres fournis par FLANDRE et VAGO (93) en 1963 pour leur culture de tissus d'Helix, on est frappé par le taux très bas des constituants de la solution saline. Bien que les auteurs précisent que "sa composition répond aux données fournies par l'analyse qualitative et quantitative du sérum d'Escargot", ils ne donnent pas les bases exactes du calcul d'une telle solution. Cependant, ces taux peuvent s'expliquer du fait que ces auteurs utilisent comme milieu nutritif des extraits embryonnaires de poulet et du plasma de coq, qui bien que dilués doivent augmenter le Δ de leur solution.

L'augmentation de la concentration ionique due à l'adjonction de substances nutritives dans le milieu de survie, ne doit pas en effet être négligée. Principalement dans notre propre étude, où, outre la survie des explants, celle de la larve infestante dans le milieu, doit être envisagée. C'est pourquoi nous avons évité d'introduire dans notre milieu nutritif, sérum ou extraits embryonnaires de Vertébrés qui auraient empêché toute vie des miracidiums dans notre solution finale ; le rôle toxique du sérum de Vertébrés (Cheval et Mouton en particulier) sur les miracidiums ayant été démontré (KAGAN 1955) (140).

La toxicité de tels composants envers les larves explique aisément que CHERNIN note en 1963, dans son étude sur la culture de tissus de coeurs de Planorbes, que les miracidiums sont incapables d'éclore dans sa solution ou meurent immédiatement lorsqu'ils y sont transférés après éclosion. Car, même si sa solution saline était équilibrée avec le milieu interne des Planorbes, cet auteur ajoute dans son milieu nutritif du sérum de Cheval, du liquide amniotique et de l'extrait embryonnaire de Boeuf, qui modifient considérablement le Δ^o de la solution dont la concentration ionique doit alors être trop élevée pour les larves.

CHERNIN note également que sa solution, par contre, n'est pas toxique pour les cercaires. Ceci n'a rien d'étonnant car les cercaires étant dans le cycle des Bilharzies, la forme infestante des Vertébrés, doivent supporter de ce fait, des concentrations ioniques bien supérieures à celles tolérées par les miracidiums, qui eux, parasitent les tissus des Mollusques ; d'autre part il ne semble pas se préoccuper des observations de KAGAN sur l'utilisation de produits animaux hétérologues.

Ainsi, dans les conditions où nous nous sommes placés, les composants de notre solution se rapprochent le plus possible de la teneur du milieu interne de nos Planorbes, et les éléments nutritifs ne perturbent pas le Δ^o d'une façon notable et sont de nature homologue.

En outre le pH de notre solution tamponnée varie peu durant les expériences et les solutions stocks sont très stables (plus de six mois). Le calcium est fourni sous forme de sel organique, le gluconate soluble, qui apporte un anion très assimilable.

Les substances nutritives additionnées améliorent les résultats en qualité et en durée. La survie est prolongée de huit à dix jours en solution saline seule, à quatre semaines en milieu nutritif. La différenciation structurale s'établit plus lentement. La nutrition des fragments par voie transtégumentaire à partir de substances dissoutes dans l'eau doit donc être possible. Et nos résultats confirment l'existence de ce mode de nutrition pour des fragments séparés de l'organisme et capables d'utiliser les substances contenues dans le milieu nutritif, hypothèse formulée par J. A. THOMAS et BORDERIOUX

dans leurs études sur les organes des Echinodermes et des Urodèles en 1948 (241-242), mais déjà soupçonnée par JOLLY en 1904 (134) qui provoque des mues chez le Triton par simple "réalimentation" après une longue période de jeûne.

B - Les phénomènes relatifs à l'explant en survie, la dédifférenciation structurale.

La cicatrisation.

Nous avons étudié dans un chapitre précédent les processus de cicatrisation. Elle ne nous a jamais posé de problèmes, et les phénomènes observés confirment ceux décrits par J. André THOMAS et coll. au cours de leurs travaux sur la culture organo-typique en milieu liquide d'organes d'Invertébrés.

La dédifférenciation structurale.

Malgré l'apport d'éléments nutritifs assimilables, les phénomènes de dédifférenciation structurale conduisant à la mort de l'explant n'ont jamais pu être évités. Cette dédifférenciation est constante et corrélative et la dégénérescence interne. Nous pouvons tenir encore pour valable ce qu'écrivait Cl. BERNARD : "La dégénérescence qui s'augmente sans cesse par sa propre influence sur la formation des "milieux intérieurs" de l'animal a été la cause de sa mort".

Bien que chaque groupe zoologique ait ses propres possibilités de survie et de résistance à la dédifférenciation, il apparaît toujours que celle-ci est plus rapide et plus prononcée pour des fragments de petite taille et que son évolution tend à composer l'état d'équilibre le plus simple conduisant à la forme de moindre résistance : la sphère.

Ces formations arrondies qui marquent le terme de la régression structurale ont été décrites, avant nous, par maintes auteurs. Dès 1909, CARL GREEN (35) les mentionne dans le résultat de ses survies de tentacules d'Actinies, ainsi que SCHULTZ en 1916 (201) pour les pieds ambulacraires d'Oursin, et ZWEIBAUM en 1915 (273) pour les branchies d'Anodontes. Plus tard, elles sont également l'aboutissement général de toutes les cultures organo-typiques de J. André THOMAS et de son école (240).

La vitesse d'établissement de cette dédifférenciation et le temps de survie possible de chaque organisme sont variables et constituent comme le disait Paul BERT sa "vitalité propre" correspondant aux propres exigences métaboliques et énergétiques de l'organe ou de l'espèce considérée.

Nous rejoindrons donc l'hypothèse émise par J. André THOMAS en 1941 (231-232), que la cause principale de la différenciation structurale au cours de la survie est l'épuisement graduel de substances de réserve indispensables au maintien des structures internes. Les causes secondaires les plus importantes semblent être l'absence de squelette continu d'une part [phénomènes démontré par E. SCHULTZ en 1916 (201) sur les tubes ambulacraires d'Echinides, par ZWEIBAUM en 1925 (273) sur l'épithélium des branchies d'Anodontes et par les expériences de J. André THOMAS de 1939 - 1948 (240) sur divers organes externes d'Invertébrés et de Vertébrés inférieurs (tubes ambulacraires d'Echinides et d'ophiurides en particulier)] , et l'absence d'éléments nerveux importants d'autre part.

Nous ne sommes pas à même, dans ce travail, de préciser le rôle exact du système nerveux dans le maintien de la différenciation structurale, mais nous avons pu montré son action bénéfique dans la conservation des structures.

Cependant le rôle du système nerveux dans le maintien des phénomènes de la vie avait déjà été soupçonné par Paul BERT (13) qui écrivait dans sa thèse : "Cet isolement des éléments... peut permettre d'étudier les modifications qui surviennent mieux quand on les soustrait à certaines influences, comme celle du système nerveux, et de s'éclairer par conséquent sur la valeur de ces influences".

Depuis lors, outre les phénomènes très particuliers de neuro-sécrétion qui influent sur la mue des Insectes, le rôle trophique du système nerveux dans maints développements biologiques a été souligné par de nombreux auteurs. Ainsi l'importance du système nerveux dans la régénération et la reproduction des Vers annelés a été bien étudiée, que ce soit chez les Lombrics par AVEL (2-3) entre autres (1929-1947), ou chez les Polychètes (HARMS 1948) (121) ; plus récemment, DURCHON en 1963 (76 à 79) écrit que l'on pourrait impliquer un rôle actif à la chaîne nerveuse dans le déclenchement de l'épitoquie des Néréidiens. D'autre part, YOUNG de HAN, travaillant sur l'intestin embryonnaire en survie, par la méthode de WOLFF et HAFFEN souligne la nécessité de la présence du système nerveux pour le maintien des mouvements. La persistance d'éléments nerveux lors de notre propre expérimentation joue-t-elle un rôle purement trophique ou a-t-elle une action directe de diffusion de substances spéciales ? Ces questions devront être résolues dans des expériences ultérieures.

Quoiqu'il en soit, il apparaît que, parmi l'ensemble des facteurs déterminants que les expériences permettent d'envisager, la présence d'éléments nerveux joue un rôle important sur la persistance de la différenciation structurale des explants. En l'absence d'éléments nerveux importants, la différenciation s'établit plus rapidement et plus profondément.

C - Le parasitisme, l'évolution du parasite dans l'explant, la spécificité du choix du Mollusque par les miracidiums,

Du point de vue parasitologique, la dédifférenciation structurale, au contraire de l'hypothèse formulée au départ de cette étude, ne fait pas perdre leur spécificité aux explants. En effet, un tentacule qui a amorcé sa dédifférenciation tissulaire, n'est plus capable de recevoir un miracidium. La pénétration des tissus de Mollusques par des larves de Schistosomes est donc un phénomène complexe lié à la présence d'une organisation tissulaire intacte, où la spécificité doit avoir des causes multiples.

Expérimentalement, dans un tentacule en survie, l'attraction persiste tant que la sécrétion de substances spécifiques par l'épithélium est en quantité suffisante. Ensuite, la pénétration et le développement ultérieur du parasite sont possibles, dans des conditions analogues à celles observées dans la nature, tant que la dégénérescence des tissus n'est pas trop prononcée ; c'est-à-dire, tant que des substances nutritives peuvent être fournies par l'organisme parasité. L'arrêt de l'évolution du parasite au stade sporocystes III est sans doute, pour une part, dû à la disparition des substances de réserve des tissus de l'explant, le parasite ne trouvant plus de quoi poursuivre son développement.

D'autre part, il faut remarquer que, normalement, pour poursuivre leur évolution, les sporocystes à ce stade migrent de leur lieu de pénétration vers l'hépatopancréas où ils se fixent définitivement, pour atteindre le stade cercaire. On peut donc supposer que cette glande, ou la glande hermaphrodite voisine, apportent des substances nécessaires à la transformation des derniers stades évolutifs du parasite.

Cependant, des essais d'adjonction de tels extraits glandulaires dans notre milieu de survie ont conduit à la mort quasi immédiate des explants.

Dans le cas de tentacules non réceptifs, l'évolution abortive est tout-à-fait comparable à ce que l'on observe dans les tissus des Mollusques vivants. Les figures obtenues dans l'explant, sont à tous points superposables à celles publiées par les auteurs ayant étudié ce problème dans les Mollusques (NEWTON) (184), (FILES) (88-89), ou par nous-mêmes, dans des témoins comparatifs.

D'après les résultats ainsi obtenus, on peut donc envisager un schéma général pour le choix du Mollusque par les miracidiums, où la spécificité parasitaire interviendrait à différents niveaux.

En effet, il faut sans doute faire intervenir des phénomènes et des facteurs différents agissant successivement dans le temps.

En premier lieu, doit jouer le phototropisme positif et le géotropisme négatif dont sont doués les miracidiums. Ces deux facteurs amenant les larves une fois écloses dans la zone de surface de l'eau où se rassemblent la plupart des Mollusques hôtes - vecteurs possibles.

Puis, doit intervenir le mécanisme dont NEUHAUS (180) (181) a fait l'hypothèse pour les miracidiums de *Fascicola hepatica*. Les larves seraient entraînées par les courants créés par les battements des cils de l'épithélium du Mollusque et lorsque celles-ci seraient à une distance suffisamment réduite, le mécanisme de l'attraction pourrait jouer.

Ce pouvoir attractif serait lié à la sécrétion par l'épithélium de revêtement et libération dans le milieu environnant, de substances à caractères de mucopolysaccharides ou de glucoprotéines.

Ces substances seraient capables d'être décelées par le miracidium à une courte distance. La quantité de ces substances présentes dans l'environnement immédiat du Mollusque lors du contact miracidium-Planorbe pourrait expliquer les différents comportements observés par les auteurs en contradictions ; de faibles quantités pourraient même exister chez certaines espèces réfractaires à la pénétration ultérieure, mais entraînant une certaine attraction (cf résultats obtenus par SUDDS en 1953) (225).

D'autre part, le rassemblement dans une enceinte réduite (boîte de Petri) de nombreux Mollusques conduirait à l'accumulation de ces substances et ferait disparaître ce pouvoir attractif par émoussement du stimulus (WRIGHT 1959) (271).

En outre, la diffusion de cette substance dans le milieu liquide environnant doit se faire par gradients, ce qui est en rapport avec la direction des mouvements des miracidiums vers les Mollusques. Les larves n'atteignent jamais un Mollusque directement en ligne droite. Toute une série de mouvements ondulatoires avec approche puis éloignement successifs, prélude au contact direct. Si on en croit les travaux de LAING (152) effectués chez les Insectes en 1937, une approche directe, en ligne droite, par un animal, d'un objet quelconque est le résultat d'un stimulus optique, tandis que des mouvements ondulatoires et circulaires traduiraient un stimulus sensoriel.

Une fois les miracidiums arrivés au contact direct des tissus du Mollusque, le phénomène de pénétration active débute. Outre l'action purement mécanique de l'effraction due aux contractions violentes de la larve, un deuxième système : compatibilité et incompatibilité doit entrer alors en jeu. Ce système doit être régi par des enzymes, ou substances voisines, appartenant aussi bien à l'hôte qu'au parasite, avec complexe enzyme-substrat.

I° - Dans le cas où la pénétration et l'évolution s'effectuent normalement et sans réactions, on peut concevoir l'absence de toute substance antagoniste ; seul alors suffit le contenu des glandes céphaliques de pénétration du miracidium pour la digestion des tissus de l'hôte, couplé aux mouvements musculaires actifs.

La poursuite du développement du parasite s'effectuerait grâce à ses propres substances de réserve et grâce aux substances nutritives présentes dans les tissus de l'hôte parfaitement assimilables par le parasite. Une preuve en est la diminution du taux des polysaccharides dans les tissus des Mollusques infectés.

Ainsi lorsqu'on détermine par la réaction colorée P. A. S. Schiff la teneur en polysaccharides des individus infectés par les Schistosomes, on peut noter, que dans les spécimens infestés, les conditions sont à peu près les mêmes que pour des individus sains, mais la quantité totale de polysaccharides est moindre ; la couleur générale des muscles est plus pâle, même sans action d'une diastase ; il y a donc diminution du glycogène. Les tubules de la glande digestive ont également perdu la majorité de leur glycogène, et il y a une grosse réduction de la quantité des polysaccharides contenus dans la glande hermaphrodite par contre, le galactogène de la glande de l'albumine ne semble pas touché. (Von BRAND et FILES) (26).

En ce qui concerne le parasite lui-même, les sporocystes et les cercaires contiennent aussi des polysaccharides. Ceux-ci paraissent être des substances de nature chimique voisine du mucus et des sécrétions épithéliales, car la couleur, après action du Schiff en est exactement la même.

II° - Lorsque la pénétration s'effectue, mais que l'évolution est stoppée, il semble qu'interviennent des réactions immunitaires de l'hôte. Des substances à caractère d'anticorps, peut-être des anti-enzymes, entreraient alors en jeu, bloquant le développement du parasite. Tous les stades du "refus" pourraient donc exister depuis l'impossibilité complète de pénétration jusqu'à pénétration et le début du développement. Ce dernier peut être ainsi stoppé à différents niveaux, et au maximum, le parasite est assimilé par les tissus de l'hôte à un corps étranger, digéré et détruit : ainsi que nous l'avons mis en évidence dans nos coupes de Planorbes entiers et d'explants.

Cette théorie s'appuie sur les résultats d'une série de recherches effectuées tant par nous-mêmes, que par divers auteurs qui mettent en évidence la présence au sein des Mollusques de facteurs pouvant être responsables de l'immunité tissulaire et hormonale des différentes espèces, ou tout au moins, de différences biologiques pouvant expliquer les divers rapports miracidiums-hôtes.

Ces études peuvent être résumées en quatre groupes :

1°/ L'analyse chromatographique du milieu interne des différentes espèces de Mollusques.

2°/ Les études électrophorétiques et immunoélectrophorétiques des constituants de l'hémolymphe et des tissus des Mollusques aux divers stades de leur développement.

3°/ L'existence de facteurs immobilisant les miracidiums dans les tissus de certaines espèces de Mollusques.

4°/ La possibilité de la transmission génétique dans les générations successives de Mollusques, de la spécificité vis-à-vis des larves de Schistosomes.

1° - L'analyse chromatographique de l'hémolymphe de Planorbes.

Les expérimentateurs ont recherché les différences dans la composition en acides aminés de l'hémolymphe et des tissus des diverses espèces de Mollusques, dans le but de trouver, dans la répartition de ceux-ci, un support aux différences de susceptibilité envers les Schistosomes.

Des travaux originaux de TARGETT, en 1962, (227-228), il résulte que la composition en acides aminés des tissus des Mollusques est différente selon l'espèce considérée.

L'analyse chromatographique des hémoglobines a montré la présence de dix sept acides aminés dans la plupart des espèces, mais avec des différences quantitatives. En ce qui concerne plus particulièrement A. glabratus, douze acides aminés libres ont été trouvés dans le sang en quantité variable, mais toujours faible.

La phénylalanine et la tyrosine sont très rarement trouvées chez A. glabratus, mais existent chez P. corneus. Par contre, A. glabratus est le seul chez lequel ait été détecté la présence de méthionine qui n'est pas retrouvée chez les autres Mollusques, P. corneus ou Lymnea stagnatis. Par contre, chez des spécimens d'A. glabratus, infestés par S. mansoni, la concentration de tous les acides aminés se trouve réduite, et la méthionine n'est plus détectée parmi les aminoacides libres.

Des analyses chromatographiques similaires exécutées sur des extraits de cercaires de S. mansoni montrent la présence dans les larves des dix sept acides aminés y compris la méthionine. Ce qui pourrait laisser à penser que la méthionine est un élément indispensable au développement des derniers stades des sporocystes-filles.

Cependant le rôle de la méthionine, ou de tout autre acide aminé, ne semble pas essentiel dans l'attraction, la pénétration et le développement du parasite. En effet, lors de nos propres expériences d'attraction par des substances chimiques, aucun acide aminé, et en particulier la méthionine, n'a jamais donné de résultats positifs.

D'autre part, l'adjonction dans notre milieu nutritif de survie, d'extrait de levure et d'hydrolysats de caséine, riches en acides aminés (3 % de méthionine, dans les deux substances), offre aux explants la possibilité de s'enrichir en méthionine (ou en tout autre acide aminé) par imbibition tissulaire, et les tentacules ainsi traités n'ont jamais montré de dispositions plus favorables à la pénétration des miracidiums et au développement total des sporocystes.

Si, maintenant, nous reprenons les travaux de Donald DUSANIC et Robert LEWERT (80) qui, en 1963, analysent les changements apportés dans la composition en protéines et en acides aminés libres, de l'hémolymphe d'A. glabratus après exposition aux cercaires de S. mansoni ; il en ressort que, quarante cinq minutes après l'infestation il y a augmentation du taux de lysine, proline et glycine, avec apparition pour une durée de vingt quatre heures dans l'hémolymphe, de deux acides aminés présents chez le sujet sain uniquement dans les extraits de glandes digestives et d'ovotestis. Mais ces auteurs n'ont fait aucune constatation quant à la présence ou l'absence de la méthionine.

Si de telles manifestations étaient seules en cause dans le développement spécifique du parasite, les résultats obtenus dans nos explants qui, eux, ne participent pas à ces modifications d'ordre général de l'individu, devraient différer de ceux obtenus dans le Mollusque entier. Or, en ce qui concerne l'acceptation ou le refus pur et simple, nous n'avons pu observer aucune disparité ; seules les réactions secondaires de défense tissulaire (formation de coque fibreuse) ne se produisent pas dans les explants.

2° - L'étude électrophorétique de l'hémoglobine de différentes espèces de Mollusques a montré un schéma constant pour chaque espèce ; mais des différences selon l'âge des sujets ont été observées (WRIGHT and ROSS 1959) (272), TARGETT 1961 (226).

Etant donné qu'il est connu que des jeunes Mollusques sont plus sensibles à l'infestation par les Schistosomes que les adultes, on peut envisager que les différences apparaissant dans les tracés électrophorétiques traduisent ces degrés de susceptibilité. Et ces faits sont en faveur de la formation de substances voisines des anticorps au cours de la vie des Mollusques qui entreraient en jeu lors des tentatives d'infestation.

D'autre part en 1962 TRANVANKY, ROSE et LAUDE (244) réalisent l'analyse immunoélectrophorétique de la structure antigénique de quatre espèces de Mollusques. Pour ce faire, ils préparent des sérums de Lapin anti-Mollusque par immunisation des animaux à l'aide d'extraits totaux de Mollusques lyophilisés, et procèdent ensuite à l'analyse immunoélectrophorétique en gélose.

Par cette méthode ces auteurs révèlent la présence de neuf fractions communes entre A. glabratus, vecteur de Schistosomes et P. corneus réfractaire, mais également l'existence de six fractions spécifiques.

Des résultats similaires sont obtenus avec les autres espèces étudiées (Limnea palustris, L. stagnalis et L. limosa), ce qui leur permet de proposer l'analyse immunoélectrophorétique comme moyen d'analyse taxonomique des espèces voisines car cette méthode révèle des fractions protéiques qui constituent l'originalité de chaque espèce.

Leur expérimentation peut se résumer dans le tableau ci-dessous :

Antigènes analysés	Nombre de fractions relevées	Fractions communes aux antigènes				
		<u>A. glabratus</u>	<u>P. corneus</u>	<u>L. palustris</u>	<u>L. stagnalis</u>	<u>L. limosa</u>
<u>A. glabratus</u>	15	15	9	4	4	4
<u>P. corneus</u>	15	9	15	4	4	3
<u>L. palustris</u>	15	5	4	15	11	8
<u>L. stagnalis</u>	16	4	4	11	16	8

Ce qui correspond à des différences réelles dans la structure des protéines antigéniques et explique l'impossibilité de développement des miracidiums dans les explants provenant de Mollusques non susceptibles par incompatibilité tissulaire profonde ; nos explants ne comportant que cette possibilité de défense corroborent ces résultats.

3° - La présence de substances immobilisatrices des miracidiums dans les extraits de Mollusques.

Nous avons mis en évidence (1959) (10) la présence de substances immobilisantes pour les miracidiums de S. mansoni dans les tissus des Mollusques réfractaires à l'infestation.

Des miracidiums fraîchement éclos (six à huit) sont répartis dans des verres de montre contenant huit gouttes d'extraits aqueux de Mollusque au $1/10^{\circ}$ et les phénomènes d'immobilisation sont suivis à la loupe binoculaire pendant une heure. L'immobilisation, quand elle se produit, débute par une agglutination des cils de la partie postérieure de la larve. Une constriction nette apparaît ensuite vers le milieu du corps là où se place la ligne d'interruption des cils vibratiles. Les images ainsi obtenues sont superposables en tous points à celles obtenues lors de tests sérologiques d'immobilisation des miracidiums en présence d'immun-sérums. Les extraits de Planorbes furent préparés à partir de deux espèces et de quatre souches.

Planorbis corneus, provenant de la région parisienne,

Australorbis glabratus, souche de Pointe à Pitre

" du Brésil

" des Caraïbes (Porto Rico)

Les miracidiums testés provenaient de l'éclosion des oeufs issus du contenu intestinal ou des foies de Souris et de Hamster infestés expérimentalement avec des cercaires provenant d'une souche de S. mansoni des Caraïbes.

Les résultats obtenus peuvent être résumés ainsi :

P. corneus : L'immobilisation de tous les individus est obtenue dans un laps de temps variant entre un quart d'heure et une demie heure.

A. glabratus :

Souche Brésil : L'immobilisation des miracidiums est obtenue entre une demi-heure et trois quarts d'heure, un individu survit quelquefois, mais sa mobilité est très diminuée.

Souche Pointe à Pitre : Tous les miracidiums restent vivants après une heure, la mobilité de quelques individus semble parfois légèrement atteinte.

Souche Caraïbes : Tous très mobiles et vivants durant plusieurs heures.

Témoins en eau de fontaine : très mobiles ; en eau physiologique : tous morts en moins de cinq minutes.

A l'examen de ces résultats il est intéressant de remarquer que les extraits de P. corneus déterminent l'immobilisation totale dans le temps le plus court. Cette espèce est entièrement réfractaire à la pénétration des miracidiums et cette incompatibilité se manifeste par une immobilisation très rapide.

Les extraits d'A. glabratus (souche n° 2 du Brésil) provoquent une immobilisation dans un temps plus long. Cette souche, bon vecteur de bilharziose dans son pays d'origine, n'a jamais pu être infestée expérimentalement par des miracidiums de provenance des Caraïbes.

Les extraits de la souche n° 1 originaire de Pointe à Pitre ne donnent naissance à aucune immobilisation. Cependant, au laboratoire, nous n'avons jamais pu obtenir un cycle complet et la formation de cercaires par passage de miracidiums issus de la souche de Caraïbes, chez A. glabratus de Pointe à Pitre. La pénétration a lieu, mais l'évolution avorte, on peut noter une diminution de la vitalité n'allant pas jusqu'à l'immobilisation mais sensible cependant.

Les extraits de la souche n° 3 en provenance des Caraïbes et correspondant à la seule souche miracidienne, ne donnent naissance à aucun phénomène d'immobilisation, même après plusieurs heures.

Cela semble favorable à l'hypothèse selon laquelle nous nous trouverions simplement en face d'une réaction d'incompatibilité dont l'immobilisation est un des aspects. Selon les individus, on peut envisager que l'on est en présence, soit d'une inhibition de la sécrétion des glandes céphaliques de pénétration ou d'une neutralisation de celle-ci, soit d'un véritable blocage des réactions vitales du miracidium conduisant celui-ci à l'immobilisation ou même des deux actions réunies.

Il est à remarquer que la pénétration ne se réalise qu'avec des individus donnant peu, ou pas du tout, de réactions d'immobilisation. Dans les cas correspondant à une immobilisation forte (P. corneus), nous n'observons aucune pénétration. Il est, cependant, difficile d'imaginer que la mobilité soit seule en cause car même dans les cas où l'immobilisation se manifeste avec intensité, il faut un certain temps de latence avant que cette action puisse se manifester.

Les incompatibilités entre Planorbes et miracidiums semblent donc entrer dans le cadre des réactions immunitaires, ou enzyme-substrat.

Le fait que l'incompatibilité se manifeste parallèlement dans l'explant et dans l'individu entier, met en évidence des facteurs tissulaires importants et permet de les considérer comme primordiaux.

Les réactions de défense interne de l'individu par remaniements profonds (composition de l'hémolymph, ou réactions tissulaires secondaires par formation de coque fibreuse) inexistantes dans l'explant, nous ferons reporter ce facteur au deuxième plan.

4° - La transmission génétique de potentialité de résistance ou de susceptibilité à l'infestation à l'intérieur d'une espèce des Mollusques.

C'est WALTER L. NEWTON (185) qui s'est attaché à démontrer la transmission génétique des facteurs conditionnant la susceptibilité des Mollusques vis-à-vis des miracidiums de Schistosomes.

Cet auteur a effectué des croisements entre des individus de deux souches d'Australorbis glabratus susceptibles toutes deux à l'infestation par des miracidiums de S. mansoni, mais incompatibles entre elles (souches du Brésil et de Porto Rico). Afin de s'assurer de l'effectivité des croisements, une variété de mutants à coloration rouge a été sélectionnée pour ces expériences.

Cet auteur arrive ainsi à démontrer que le caractère de susceptibilité aux miracidiums est un caractère héréditaire. Ainsi dans une population F_3 issue de parents F_2 non susceptibles, on trouve des individus fortement susceptibles possédant les caractéristiques génétiques d'un grand-parent F_1 susceptible. Ce facteur génétique est tout-à-fait compatible avec les manifestations que nous avons observées à la fois chez l'individu entier et dans les explants et nous semble infirmer les affirmations de Mac QUAY (166).

Ainsi le schéma proposé rend compte des résultats expérimentaux des divers auteurs qui souvent s'opposaient quant à leur théorie respective sur les relations miracidiums-Planorbes, et pour lesquels la culture organo-typique en milieu liquide peut amener quelques suggestions intéressantes.

Des facteurs mécaniques, physiologiques, et immunologiques entrent en jeu tout à tour dans le développement de l'infestation des Mollusques par les miracidiums.

1 - Facteurs mécaniques d'approche.

2 - Facteurs physiologiques de la sécrétion de substances à caractères de mucopolysaccharides, spécifiques et attractives.

3 - Facteurs à la fois mécaniques et physiologiques de la pénétration active de la larve : mouvements musculaires + sécrétion de la glande céphalique + compatibilité enzyme-substrat.

4 - Facteurs physiologiques - Présence des substances nutritives nécessaires au bon développement du parasite dans un hôte : polysaccharides, acides aminés.

5 - Facteurs immunologiques conditionnant l'acceptation ou le refus des sporocystes en formation, avec des degrés dans l'immunité suivant l'âge et l'espèce.

Avec, dans le cas de refus, l'intervention des deux phénomènes suivants :

I°/ Incompatibilité tissulaire ou génétique, primordial

II°/ Défense de l'organisme, secondaire et non essentiel.

Au terme de cette étude, nous pouvons donc conclure que, intermédiaire entre la culture tissulaire et l'élevage, la méthode de culture organo-typique en milieu liquide ouvre des perspectives très intéressantes pour des recherches nouvelles en parasitologie. Elle pourra être facilement appliquée dans son principe de base, à des survies d'organes ou de parties d'organes appartenant soit à l'hôte intermédiaire, soit à l'hôte définitif, ou même au parasite lui-même, et permettra ainsi l'étude de certains problèmes parasitologiques sous un angle plus nouveau et plus pratique.

CONCLUSIONS GENERALES

Dans ce travail, nous nous sommes proposés d'introduire parmi les méthodes applicables à la Biologie parasitaire, le maintien en survie "in vitro" d'organes, ou de fragments d'organes.

Nous avons ainsi entrepris la réalisation et l'étude de la survie de tentacules de Planorbes, hôtes intermédiaires vecteurs des Schistosomes, puis tenté leur infestation "in vitro" par le parasite.

Dans une première partie un rappel historique de l'évolution des idées et des recherches sur les phénomènes de survie ainsi que des diverses méthodes utilisées pour ces études, nous a permis de situer notre propre expérimentation dans ce très vaste domaine.

Dans la partie expérimentale, nous avons appliqué la méthode de culture organo-typique en milieu liquide renouvelé, proposée par J. André THOMAS en 1941 pour les organes de Vertébrés inférieurs, aux problèmes propres de notre expérimentation et aux besoins spécifiques de nos explants.

C'est ainsi que nous avons été amenés à aborder le problème de désinfection préalable des Mollusques avant la section de l'explant.

Puis notre étude s'est portée sur la mise au point des trois solutions devant composer le milieu de survie :

- La solution physiologique, dont la composition doit se rapprocher le plus possible du milieu interne des Australorbis, ne pas dépasser les limites de toxicité fixées pour les Planorbes entiers, être équilibrée, tamponnée, ajustée au pH compatible avec la survie des explants et stérilisée.

Cette solution a été établie sur la base de l'analyse de l'hémolympe des Planorbes.

- La solution nutritive qui est indispensable à la prolongation de la survie et doit apporter les éléments essentiels à la nutrition des explants sans modifier par trop la balance ionique du milieu final.

- Les antibactériens qui furent choisis pour leur compatibilité avec l'intégrité tissulaire et le maintien de la survie des tentacules, les tissus des Planorbes s'étant montrés très sensibles aux antibiotiques utilisés habituellement en culture de tissus.

Cette solution de survie dont le pH s'est révélé stable et le Δ° cryoscopique très voisin de celui du milieu interne des Planorbes a permis le maintien en survie des tentacules de Planorbes appartenant à deux espèces et trois souches différentes, pendant une durée au moins égale à trois semaines.

Malgré la possibilité de nutrition par voie transtégumentaire, la dédifférenciation structurale liée à la dégénérescence interne des tissus a toujours été de règle et a été la cause de la mort de l'explant, qui tend au cours de la survie à prendre l'état d'équilibre le plus faible c'est-à-dire la sphère.

Parmi l'ensemble des facteurs déterminants, que les expériences permettent d'envisager, il est indéniable, que le système nerveux joue un rôle non négligeable dans le maintien de la différenciation tissulaire. En l'absence d'éléments nerveux importants la dédifférenciation au sein de l'explant est toujours plus rapide et plus prononcée.

Dans la poursuite d'une étude parasitologique de tels explants ont été infestés avec succès par des miracidiums de S. mansoni. Et dans le cas d'explants provenant de Mollusques réceptifs à la souche de Schistosomes, l'évolution s'est poursuivie jusqu'aux stades sporocystes filles III d'une manière tout-à-fait analogue à ce qui se passe in vivo. Mais le développement du parasite n'a pu s'effectuer au-delà de ce stade et les cercaires n'ont jamais pu être obtenues.

Dans le cas d'un explant provenant d'une souche de Planorbes d'origine géographique différente de celle de la souche de S. mansoni, l'évolution abortive et les réactions cellulaires de l'hôte ont été tout-à-fait comparables in vitro et in vivo.

L'action de certaines substances attractives a pu être étudiée et la présence de mucopolysaccharides sécrétés par l'épithélium mise en évidence. Ces mucopolysaccharides se sont montrés responsables du pouvoir d'attraction miracidienne.

A partir des résultats de cette expérimentation, il nous a été possible d'envisager un schéma général quant au déterminisme du choix d'un Mollusque par un miracidium et de formuler quelques hypothèses sur les raisons d'une spécificité parasitaire très étroite.

La méthode de culture organo-typique en milieu liquide, nous a, en outre, permis d'apporter quelques éclaircissements à des problèmes immunologiques en éliminant les réactions de défense d'ordre général de l'individu, et en mettant l'accent sur la spécificité propre des tissus.

De l'étude expérimentale ainsi entreprise, il nous paraît possible de dégager certaines conclusions :

1 - La méthode de culture organo-typique en milieu liquide renouvelé, proposée par J. André THOMAS en 1947 comme moyen d'analyse morphogénétique, a été adaptée par quelques modifications, à la survie des tentacules de Planorbes. Ceux-ci ont été sectionnés et maintenus en survie in vitro pendant une durée au moins égale à trois semaines. Ces expériences ont permis l'analyse expérimentale d'un problème de Parasitologie : les mécanismes qui président à l'infestation et à l'évolution réussie ou abortive de miracidiums de Schistosoma mansoni dans les Planorbes de diverses espèces ou de provenance géographique différente.

2 - Bien que le milieu de survie soit équilibré et ajusté en ce qui concerne ses composants nutritifs, et bien que le maintien dans l'explant d'éléments nerveux importants augmente la durée de la survie et retarde la dégénérescence, la différenciation structurale est de règle. Cependant la persistance des phénomènes physiologiques est suffisante pour obtenir à l'intérieur de l'explant des développements ou des régressions du parasite d'une façon tout-à-fait similaire à ce qui se produit chez le Mollusque vivant.

3 - De tels explants en survie nous ont également permis de mettre en évidence par des méthodes histo-chimiques, des substances à caractères de mucopolysaccharide, sécrétées par l'épithélium de surface et responsables des phénomènes d'attraction miracidienne. La disparition de ces substances au cours de la survie, ou leur destruction par une mucopolysaccharidase est corrélative de la perte du pouvoir d'attraction miracidienne.

4 - Un schéma général des phénomènes entrant en jeu dans le déroulement de l'infestation d'un Mollusque par un miracidium est proposé, tenant compte des résultats expérimentaux des partisans des différentes thèses sur ce sujet souvent controversé. Nous décelons ainsi quelques facteurs susceptibles d'influencer la spécificité parasitaire.

5 - La relative facilité de la méthode utilisée, a permis ce travail, car l'étude des mêmes phénomènes chez le Mollusque entier se serait révélée beaucoup plus longue et ardue. Nous n'en voulons pour preuve que ce qu'écrivait en 1960 Richards SUDDS (225) étudiant le devenir des miracidiums dans les Mollusques par coupes histologiques de l'individu entier. . . "en dépit de sa valeur, cette méthode requiert un temps et des efforts considérables du fait que des milliers de coupes doivent être effectuées dans une large expérimentation. . . Ceci peut-être, est responsable du peu de publications en faisant état pour de telles études".

ooo0ooo

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ABDEL-MALEK (E. T.) : Susceptibility of the snail Biomphalaria boissyi to infection with certain strains of Schistosoma mansoni. Amer. J. Trop. Med. (1950), 30 (6), 887.
- (2) AVEL (M.) : Recherches expérimentales sur les caractères sexuels somatiques des Lombriciens. Bull. Biol. France-Belg. (1929), 63, 149.
- (3) AVEL (M.) : Les facteurs de la régénération chez les Annélides. Rev. Suisse. Zool. (1947), 54, 219.
- (4) BALTZER (F.) : Echiuriden I Echiurus abyssalis Fauna. Flor. Golfes Neapel. Monogr. (1917), 34, 227.
- (5) BARBOSA (F. S.) et COELHO (M. V.) : Qualidades de vêtôr dos hospediêros de S. mansoni no nordeste do Brasil.
1) Susceptibilida de d'A. glabratus e Tropicorbis centimétralis a infestação por S. mansoni. Publicações Avulsas. Inst. Aggen. Magalhães. (1954), 3, 5.
- (6) BARBOSA (F. S.) et COELHO (M. V.) : Comportamento das formas larvarias de S. mansoni en A. glabratus sujeitos a estivação. Publicações. Avulsas. Inst. Aggen. Magalhas. (1955), 3, 51.
- (7) BARNES (T. C.) : The action of sulfanilamide on tissues of cold blooded Vertebrates (frog skin and turth heart). J. Pharmacol. (1940), 70, 428.
- (8) BENEDICT (S. R.) : The influence of salts and non-electrolytes upon the heart. Amer. J. Physiol. (1908), 22, 16.
- (9) BENEX (J.) et DESCHIENS (R.) : Incidence des facteurs externes sur la longévité et la vitalité des miracidiums de Schistosoma mansoni. Bull. Soc. Path. exotique (1963), t. 56, n° 3, 987.
- (10) BENEX (J.) et LAMY (L.) : Immobilisation des miracidiums de Schistosoma mansoni par des extraits de Planorbes. Bull. Soc. Path. exotique, (1959), 52, 188.
- (11) BERREUR-BONNENFANT (J.) : Essais de culture in vitro de gonades de Crustacés. Bull. Soc. Zool. (1962), 87, n° 4, 377.

- (12) BERREUR-BONNENFANT (J.) : Survie et activité des gonades et de la glande androgène des mâles d'Orchestra gammarella en culture organo-typique. C. R. Acad. Sci. (1963), 256, 2244.
- (13) BERT (P.) : Recherches expérimentales pour servir à l'histoire de la vitalité propre des tissus animaux. Thèse Fac. Sciences Paris (1866), 95 p. Voir aussi : C. R. Acad. Sci. (1865), 61, 587.
- (14) BEVELANDER (G.) et MARTIN (J.) : Culture of mantle tissue of marine Molluscs. Anat. Rec. (1949), 105, 614.
- (15) BICHAT (X.) : Anatomie générale (1818), T. 2. (voir 1855, 626 p. A. Delahaye, Paris).
- (16) BINET (L.), JULLIEN (A.), RIPPLINGER (J.), et CARDOT (J.) : Sur une substance de choix la glucosamine, pour assurer une survie de longue durée du coeur isolé d'Helix pomatia. C. R. Acad. Sci. (1955), 241, 1294.
- (17) BISCHOFF (T. L.) : Ueber das Drehen des Dotters im Säugethiere während dessen Durchgang durch den Eileiter. Muller. Arch. (1841), 68, 14.
- (18) BIZZOZERO : Studi comparativi sui nemaspermii et sulle ciglia vibratili. Gaz. med. milan (1864).
- (19) BODENSTEIN (D.) : Das Determinationsgeschehen bei Insekten mit Anschluss der frühembryonalen Determination. Ergeb. Biol. (1936), 13, 174.
- (20) BOHUSLAV (P.) : Die Gewebezüchtung der postembryonalen Verdauigstraktus der Glandula salivalis und der Receptaculum seminis bei Mollusken aus der Familie Melicidae. Arch. f. exp. Zellforsch. (1933), 13, 673.
- (21) BOHUSLAV (P.) : Die explantation des reinem postembryonalen Herzbiudegewebes aus Helix pomatia. Arch. f. exp. Zellforsch. (1933), 14, 139.
- (22) BOTTAZI (Ph.) : Contribution à la physiologie du tissu des cellules musculaires - 1. La fonction motrice automatique du tissu musculaire lisse chez les Vertébrés inférieurs Arch. Ital. biol. (1899), 31, 97.
- (23) BOUNHIOL (J. J.) : Recherches expérimentales sur le déterminisme de la métamorphose chez les Lépidoptères. Bull. biol. Fr. et Bel. (1938), suppl. 24, 199 p.
- (24) BOYLE (R.) : New experiments and observations touching cold 1683. Davis London.
- (25) BROOKS (C. P.) : A comparative study of Schistosoma mansoni in Tropicorbis havanaensis and Australorbis glabratus. J. Parasit. (1953), 39, 159.
- (26) von BRAND (T.) et FILES (V. S.) : Chemical and histological observations on the influence of Schistosoma mansoni, infection on A. glabratus. J. Parasit. (1947), 33, 476.
- (27) BROUHA (L.) et FREDERICQ (H.) : Action vaso-dilatatrice des acides aminés sur les téguments artériels isolés. C. R. Soc. Biol. (1924), 91, 1169.

- (28) BROWN-SEQUARD (E.) : Du rythme dans le diaphragme et dans les muscles de la vie animale après leur séparation des centres nerveux. J. Physiologie (1850), 2, 115.
- (29) BROWN-SEQUARD (E.) : Recherches sur la possibilité de rappeler temporairement à la vie des individus mourant de maladie. J. Physiol. (1858), 1, 666.
- (30) BRUMPT (E.) : Schistosoma bovis et Schistosoma mansoni, ne sont pas transmis par Planorbis (indoplanorbis) exustus. Observations biologiques concernant ce Planorbe (autofécondation, érosion de la coquille, élevage etc...). Ann. Parasit. XIV, (1936), 5, 464.
- (31) BRUMPT (E.) : Observations biologiques diverses concernant Planorbis (Australorbis) glabratus hôte intermédiaire de Schistosoma mansoni. Ann. Parasit. (1941), 18, n° 1. 2. 3. 9.
- (32) BUSCHBAUM (R.) : Cultures of some marine Invertebrate tissues. Anat. Rec. (1936), 37, 67 supp. 1.
- (33) CAMBOUE (P.) : Prolongation de la vie chez les Papillons décapités C. R. Acad. Sci. (1926), 183, 372.
- (34) CARDOT (H.) : L'automatisme cardiaque d'après les recherches relatives aux Invertébrés. Ann. Physiol. Physicochim. biol. (1933), 9, 630.
- (35) CARLGREEN (O.) : Studien über Regeneration U. Regulationser-scheinungen. II. Ergänzende Untersuchungen au Actinarien. Svensk. Vet. Akad. Handl. (1909), 42, 1.
- (36) CARRIKER (M. R.) : Observation on the functioning of the alimentary system of the snail Lymnea stagnalis appressa say. Biol. Bull. (1946), 91, 111.
- (37) CASTAIGNE (A.) : Un facteur de diffusion différent des Hyaluronidases. Etude pharmacologique. Anesth. et Analg. (1959), 16 n° 3, 567.
- (38) CAVIER (R.) et SAVEL (J.) : La survie in vitro en milieu aseptique de l'Ascaris du Porc, Ascaris lumbricoïdes, Linné. (1758). C. R. Acad. Sci. (1952), 234, 1403.
- (39) CHABBERT (Y.) : Les disques séchés pour la préparation des solutions d'antibiotiques. Leur utilisation pour la détermination du pouvoir bactériostatique et bactéricide des antibiotiques isolés et des associations. Ann. Biol. clin. (1955), 13, 37.
- (40) CHANDEBOIS (R.) : Cultures de fragments de planaires d'eau douce. Ann. Epiphyt. (1963), 14, 141.
- (41) CHERNIN (E.) : A methode of securing bacteriologically sterile snails Australorbis glabratus. Proc. Soc. exp. Biol. (1957), a 96, 204.
- (42) CHERNIN (E.) : Studies on the biological control of Schistosome bearing snails. VII Streptomycin-induced inhibition of growth and reproduction in the schistosome-bearing snail, Australorbis glabratus. Amer. J. Hyg. (1957) b, 66, 321.
- (43) CHERNIN (E.) : Notes of the effects of various antibiotics on Australorbis glabratus. J. Parasit. (1959), 45, 268.

- (44) CHERNIN (E.) : Observations on hearts explanted "in vitro" from the snail Australorbis glabratus. J. Parasit. (1963), 49, 353.
- (45) CHERNIN (E.) et SCHORK (A. R.) : Growth in axenic culture of the snail Australorbis glabratus. Amer. J. Hyg. (1959), 69, 146.
- (46) CHERNIN (E.) et SCHORK (A. R.) : Effects of Streptomycin on the hatching of Australorbis glabratus eggs. Exp. Parasit. (1960), 9, 9.
- (47) CLEELAND (R.) : The effects of different atmospheres and various supplements in the in vitro survival and growth of Ascaris suum larvae. J. Parasit. (1963), 49, 64.
- (48) CLEELAND (R.) et KENNETH (A. L.) : "In vitro" cultivation of Ascaris lumbricoides suum larvae. J. Parasit. (1962), 48, (1), 35.
- (49) CLEGG (J. A.) : Development of sperm by S. mansoni "in vitro" Bull. Res. Coun. Israël. (1960), 8E, 1.
- (50) COHNHEIM (O.) : Versuche am isolierten überlebenden Dünndarm. Z. Biol. (1899), 38, 419.
- (51) CONTE (A.) et VANEY (C.) : Production expérimentale de Lépidoptères acéphales. C. R. Acad. Sci. (1911), 152, 404.
- (52) CORT (W. W.) : Adaptability of Schistosome larvae to new hosts. J. Parasit. (1918), 4, 171.
- (53) CORT (W. W.) ; AMEEL (V. I.) et Von der WOUDE (A.) : Early developmental stages of Strigeid mother-sporocysts. Proc. Helminth. Soc. Wash. (1951), 18, n° 1, 5.
- (54) CORT (W. W.) et OLIVIER (L.) : Early developmental stages of strigeid Trematodes in the first intermediate host. J. Parasit. (1941), 27, 493.
- (55) COUTELEN (F.) : Essais de culture "in vitro" de scolex et d'hydátides échinococciques (Echinococcus granulosus). Ann. Parasit. hum. comp. (1927), 5, 1.
- (56) COUTELEN (F.) : Contribution à l'étude "in vitro" d'embryons de Filaires. Bull. Soc. Path. exot. (1928), 21, 316.
- (57) COUTELEN (F.) : Essais de culture "in vitro" de microfilaires de Bancroft. Ann. Parasit. (1929), 7, 319.
- (58) COUTIN (R.) et GRISON (P.) : Hémichrysalides obtenues par ligature des chenilles de Laspeyressia pomonella, L. (Lepid. Torti.) en rupture de diapause expérimentale. C. R. Soc. Biol. (1949), 143, 15.
- (59) COW (D.) : Some reactions of surviving arteries. J. Physiol. (1911), 42, 125.
- (60) COWPER (S. G.) : Observations on the life cycle of S. mansoni in the laboratory with a discussion on the snail vectors of S. mansoni and S. haematobium. Ann. Trop. Med. Parasit. (1947), 41, 173.
- (61) CRAM (E. B.) et FILES (V. S.) : Laboratory studies on the snail host of S. mansoni. Amer. J. Trop. Med. (1946), 26, n° 5, 715.

- (62) CRAM (E. B.), FILES (V. S.) et JONES (M. F.) : Experimental Molluscan infections with *S. mansoni* and *S. haematobium*. Nat. Inst. Hlth. Bull. (1947), 189, 81.
- (63) CRAM (E. B.), JONES (M. F.) et WRIGHT (W. H.) : Unsuccessful attempts to infect eleven species and subspecies of domestic Planorbidae with *S. mansoni*. Proc. Helminth. Soc. Wash. (1944), 11, 6466.
- (64) CRAM (E. B.), JONES (M. F.) et WRIGHT (W. H.) : A potential intermediate host of *S. mansoni*. Science, (1945), 101, 302.
- (65) DEMAL (J.) : Culture "in vitro" d'ébauches imaginaires de Diptères. Ann. Sc. Nat. Zool. Biol. ani. (1956), 18, 155.
- (66) DEMAL (J.) et LELOUP (A. M.) : Essais de culture "in vitro" d'organes d'Insectes. Ann. Epiphyt. (1963), 14, 91.
- (67) DESCHIENS (R.) : Incidence de la minéralisation de l'eau sur les Mollusques vecteurs de Bilharzioses, conséquences pratiques. Bull. Soc. Path. exot. (1954), 47, 915.
- (68) DESCHIENS (R.) et PICK (F.) : Conservation de *Watsonius watsoni* amphistome de l'Homme et des Primates dans des conditions extérieures à l'hôte. Bull. Soc. Path. exot. (1948), 41, 490.
- (69) DIAMOND (L. S.), FRANCK (W.) et DOUVRES (F. W.) : Bacteri free cultivation of some parasitic stages of the swine Nematodes *Hypostrongylus rubides* and *Oesophagostomum quadri-spinulatum*. J. Parasit. (1962), 48, (1), 39.
- (70) DOBROWOLSKALA (N.) : Zur frage über die Gewebeskulturen bei Fishen und wirbellosen. Arch. Biol. Wiss. (1916), 20, 16.
- (71) DOUGHERTY (E. G.), RAPHAEL (J. C.) et ALTON (C. C.) : The axenic cultivation of *Rabditis briggae*. Dougherty and Nijon 1949 *Nematoda rhabditidae*. I - Experiments with chick embryo juice and chemically defined media. Proc. helminth. Soc. Wash. (1950), 17, 1.
- (72) DOUVRES (F. W.) : The use of infective larvae and in vitro grown parasitic larvae of *Cooperia punctata* to detect antibodies in the serum of a calf infected with this Nematode. J. Parasit. (1962), 48, 15.
- (73) DOUVRES (F. W.) : The "in vitro" cultivation of *Oesophagostomum radiatum*, the nodular worm of cattle. I - Development in vitamin supplemented and non supplemented media. J. Parasit. (1962), 48, 314.
- (74) DOUVRES (F. W.) et TROMBA (F. G.) : The development of *Stephanurus dentatus*, Dusing 1839, to fourth stage "in vitro". J. Parasit. (1962), 48, 269.
- (75) DU BOIS-REYMOND (R.) : Ueber die angeblich saure Reaction des Muskelfleisches. Monatsschr. d. Berl. Akad. (1859), 298.
- (76) DURCHON (M.) : Influence du cerveau sur les processus de régénération caudale chez les Néréidiens (Annélides polychètes). Arch. Zool. exp. gen. (1956).
- (77) DURCHON (M.) : Nouvelles recherches expérimentales sur l'épithèque des Néréidiens (Annélides polychètes). Ann. Sc. Nat. Zool. et Biol. ani. (1956), 18, 1.

- (78) DURCHON (M.) : Rôle du cerveau dans la maturation génitale et le déclenchement de l'épitoque chez les Néréidiens. Ann. Sc. Nat. Zool. (1956), 18, 269.
- (79) DURCHON (M.) et SCHALLER (F.) : Application de la méthode de culture organo-typique aux recherches endocrinologiques chez les Annélides polychètes. C. R. Acad. Sci. (1963), 256, 5615.
- (80) DUSANIC (D. D.) et LEWERT (R. M.) : Alteration of proteins and free amino acids of A. glabratus, hemolymph after exposure to S. mansoni miracidia. J. inf. Dis. (1963), 112, 243.
- (81) DUVAL (M.) : The molecular concentration of the blood of some fresh water Molluscs. Role of carbonates. Ann. physiol. physiochim. biol. (1928), 4, 27.
- (82) ENGELMAN (T. W.) : Physiologie des Protoplasma und Flimmerbewegung in : Hermann's Handbuch der Physiologie, Leipzig (1869), 1, 395.
- (83) FAUST (E. C.) : The reactions of the miracidia of Schistosoma japonicum and S. haematobium in the presence of their intermediate hosts. J. Parasit. (1924), 10, 199.
- (84) FAUST (E. C.) et HOFFMAN (W. A.) : Life history of Manson's blood Fluke (S. mansoni). I - Extramammalian phase of the cycle. Proc. Soc. exp. Biol. (1934), 31, 474.
- (85) FAUST (E. C.) et HOFFMAN (W. A.) : Studies on schistosomiasis mansoni in Porto Rico III - Biological studies. I - The extramammalian phases of the life cycle. Porto Rico J. Pub. Health. and Trop. med. (1935), 10, 1.
- (86) FELL (H. B.) : Experiments on the differentiation "in vitro" of cartilage and bone. Arch. exp. Zellforsch. (1928), 7, 390.
- (87) FELL (H. B.) : Recent advances in organ culture. Sc. Progress. (1953), 162, 212.
- (88) FILES (V. S.) : A study of the vector parasite relationship in S. mansoni. Parasitology (1951), 41, 264.
- (89) FILES (V. S.) et CRAM (E. R.) : A study of the comparative susceptibility of snails vectors to strain of S. mansoni J. Parasit. (1949), 35, 555.
- (90) FISCHER (A.) : Nature of the growth promoting substances in the embryonic tissue juice. A review of the author's investigation. Acta. Physiol. Scand. (1941), 3, 54.
- (91) FISCHER (P. H.) : Détermination d'une température limite pour les contractions du coeur d'escargot. C. R. Soc. Biol. (1943), 137, 659.
- (92) FISCHER-PIETTE (E.) : Le tissu lymphocyto-gène des Crustacés étudié en survie "in vitro" C. R. Soc. Biol. (1929), 102, 764.
- (93) FLANDRE (O.) et VAGO (C.) : Culture de tissus de Gastéropodes en coagulum plasmatique. Ann. Epiphyt. (1963), 14, n° 2. 161.
- (94) FLEIG (C.) : De divers liquides organiques en tant que milieux nutritifs artificiels pour les organes isolés du corps. C. R. Soc. Biol. (1907), 63, 362.

- (95) FLEIG (C.) : Les sérums artificiels à minéralisation complexe milieux vitaux. Leurs effets après les hémorragies.
C. R. Acad. Sc. (1907), 145, 96.
- (96) FLEIG (C.) : Survie et reviviscence des spermatozoïdes dans quelques milieux artificiels, en particulier dans diverses eaux minérales et dans l'eau de mer. Action du calcium.
C. R. Soc. Biol. (1909), 67, 162.
- (97) FLORKIN (M.) : Sur la composition inorganique du milieu intérieur des Invertébrés dulcicoles ou terrestres. Bull. Soc. roy. Sc. Liège (1943), 5, 301.
- (98) FOOTE (C. L.) et FOOTE (F. N.) : Cultures d'ovaires d'*Axolotte* sur différents milieux. C. R. Acad. Sci. (1961), 253, 1351.
- (99) FRASER (L. A.) : The embryology of the reproductive tract of *Lymnea stagnalis* appressa say. Trans. Amer. Micr. Soc. (1946), 65, 279.
- (100) FREISLING (M.) et REISINGER (E.) : Zur Genese und physiologie von Restitutionskörfern aus Planariengewebsbrei. Arch. EntwMech. Org. (1958), 150, 581.
- (101) FRIEDL (F. E.) : Studies on the "in vitro" survival of larval stages of the Trematode *Fascioloides magna*, with analyses of the hemolymph and tissue culture of a snail host *Lymnea stagnalis*. Doctoral dissertation, University of Minnesota (1958).
- (102) GALLOIS (Le.) (J. J. C.) : Expériences sur le principe de la vie, notamment sur celui des mouvements du coeur sur le siège de ce principe. Un vol. (1812), 364 p. d'Hautel Paris, édit.
- (103) GATENBY (J. B.) : Outgrowths from pieces of *Helix aspersa* the common snail. Nature (1931), 2, 1002.
- (104) GATENBY (J. B.) : Absence of mitosis in tissue culture and regeneration in *Helix aspersa*. Nature, (1932), 130, 628.
- (105) GATENBY (J. B.) : A technique for studying and movement in explants from *Helix aspersa*. Arch. f. exp. Zellforsch. (1933), 13, 665.
- (106) GATENBY (J. B.) et DUTHIE (E. S.) : On the behaviour of small pieces of the pulmonary cavity wall of *Helix aspersa* kept in blood. J. roy. micr. Soc. (1932), L II.
- (107) GATENBY (J. B.) et HILL (J. C.) : Improved technique for non aseptic tissue culture of *Helix aspersa* with notes on Molluscan cytology. Quart. j. micr. Sci. (1934), 76, 331.
- (108) GATENBY (J. B.) et Mac DOUGALD (T. J.) : On the behaviour of explants of *Helix aspersa* in aseptic and non aseptic tissue culture. Quart. J. micr. Sci. (1934), 77, 129.
- (109) GAY (R.) : Essais de cultures de fragments de Lumbricidés sur milieu gélose synthétique. Ann. Epiphyt. (1963), 14 n° 2, 61.
- (110) GLASER (R. W.) et STOLL (N. R.) : Sterile culture of the free-living stages of the sheep stomach worm *Haemonchus contortus*. Parasitology. (1938a), 30, 324.
- (111) GODARD (E.) : Etudes sur la monorchidie et la cryptorchidie chez l'Homme. Un vol. (1857), 149 p., Masson, Paris.

- (112) GOMOT (G.) et GUYARD (A.) : Evolution en culture "in vitro" de la glande hermaphrodite de jeunes Escargots de l'espèce Helix aspersa. C. R. Acad. Sci. (1964), 258, 2902.
- (113) GONTCHAROFF (M.) : L'autonomie spontanée de la trompe chez Eunemertes echinoderma. C. R. Acad. Sci. (1958), 246, 1296.
- (114) GONTCHAROFF (M.) : L'autogreffe de la trompe chez Eunemertes echinoderma (Marion). C. R. Acad. Sci. (1958), 247, 246.
- (115) GORDON (B. M.), DAVEY (T. H.) et PEASTON (H.) : The transmission of human bilharziosis in Sierra-Léone, with an account of the life cycle of the Schistosomes concerned S. mansoni and S. haematobium. Ann. Trop. Med. and Parasit. (1934), 28, 323.
- (116) GOSSELIN (M.) : Sur la durée des mouvements vibratiles ciliaires chez un supplicié. C. R. Soc. Biol. (1851), 3, 57.
- (117) GUNN (J. A.) et UNDERHILL (S. W. F.) : Experiments on the surviving mammalian intestine. Quart. J. Physiol. (1914) 8, 275.
- (118) GUYARD (A.) et GOMOT (L.) : Survie et différenciation de la gonade juvénile d'Helix aspersa en culture organo-typique. Bull. Soc. Zool. Fr. (1964), 89, n° 1, 48.
- (119) D'HALLIUN (M.) : La mort cette inconnue. un vol. (1952), 460 p. Beauchesne, édit.
- (120) HAMMARSTEN (O.) : Studien über Mucin und mucinähnliche substanzen. Arch. ges. Physiol. (1885), 36, 373.
- (121) HARMS (W. R.) : Ueber ein Inkretorisches Cerebralorgan bei Lumbriciden sowie Beschreibung eines verwandten organs bei die neuen lycastis Arten. Arch. Entwicklunqsm. (1948), 143, 332.
- (122) HAUGHTON (I.) : Note on the amoeboid elements in the blood of Helix aspersa. Quart. J. Micr. Sci. (1934), 77, 157.
- (123) HEDON (E.) et FLEIG (C.) : Sur l'entretien de l'irritabilité de certains organes séparés du corps par immersion dans un liquide nutritif artificiel. C. R. Soc. Biol. (1903), 55, 1105 et C. R. Acad. Sci. (1903), 137, 217.
- (124) HEDON (E.) et FLEIG (C.) : Influence de la température sur la survie de certains organes séparés du corps et leur reviviscence dans un liquide nutritif artificiel. C. R. Soc. Biol. (1903), 55, 1199.
- (125) HEDON (E.) et FLEIG (C.) : Action des sérums artificiels et du sérum sanguin sur le fonctionnement des organes isolés de Mammifères. Arch. Inst. Physiol. (1905), 3, 95.
- (126) HERMANN (L.) : Lehrbuch der Physiologie 1896, cité in Mangold Arch. f. Physiol. (1903), 96, 510.
- (127) HILL (J. C.) : Notes on "in vitro" culture of pulmonate Molluscs Roy. Mic. Soc. (1934), ser. 3, 54, 163.
- (128) HILL (J. C. et GATENBY (S. B.) : On the behaviour of small pieces of mantle cavity wall of Helix aspersa kept in blood and various artificial media. Arch. exper. Zellforsch. (1934), 15, 195.

- (129) HOWELL (W. H.) On the relation of the blood to the automaticity and sequence of the heart-beat. Amer. J. Physiol. (1898), 2, 45.
- (130) ITURBE (J.) : El huesped intermediario del S. mansoni in Venezuela. Gaceta. Med. de Caracas (1917), 24, 515.
- (131) ITURBE (J.) et GONZALES (E.) : The intermediate host of Schistosoma mansoni in Venezuela. Laboratory of Dr. J. Iturbe Special edit. Nat. Ac. of Med. (1917).
- (132) JANDA (V.) et BOHUSLAV (P.) : Sur l'explantation du tissu de la paroi intestinale, et des amœbocytes de Lumbricus terrestris L. et des cellules d'épithélium intestinal d'Anodonta cygnea L. Publications de la Faculté des Sciences de l'Université Charles à Prague, (1934), 133, 1.
- (133) JOCOBY (I.), MEDAWAR (P. B.) et WILLMER (E. N.) : The toxicity of sulphonamide drugs to cells "in vitro". Brit. M. J. (1941), 2, 149.
- (134) JOLLY (J.) : Sur la durée de la vie et de la multiplication des cellules animales en dehors de l'organisme. C. R. Soc. Biol. (1903), 55, 1266.
- (135) JOLLY (J.) : Sur la survie des cellules en dehors de l'organisme C. R. Soc. Biol. (1910), 69, 86.
- (136) JOLLY (J.) : Sur la vie des leucocytes (démonstration). C. R. Soc. Biol. (1911), 71, 147.
- (137) JOLLY (J.) : Nouvelles observations sur la survie des leucocytes Limite de la survie. C. R. Soc. Biol. (1913), 74, 872.
- (138) JULLIEN (A.), CARDOT (J.) et RERAT (D.) : Sur les durées de survie du coeur isolé d'Helix pomatia, conservé à basse température dans des milieux salins de composition variable. C. R. Soc. Biol. (1954), 148, 694.
- (139) JULLIEN (A.), RIPPLINGER (J.), CARDOT (J.) et RERAT (D.) : Sur les temps de survie du coeur isolé d'Helix pomatia placé à basse température, et en présence de substances chimiques variées. C. R. Soc. Biol. (1955), 149, 726.
- (140) KAGAN (I. G.) : Studies on the serology of Schistosomiasis. I - The "in vitro" activity of cercariae and miracidia in serum of experimental natural and immunized hosts. Exp. Parasit. (1955), 4, 361.
- (141) KÖLLIKER (A.) : Ueber die Entwicklung der Samenfäden in Bläschen Verh. Schweiz. Nath. Ges. (1846), 8, 49.
- (142) KÖLLIKER (A.) : Physiologische Studien über die Samenflüssigkeit. Zeitschr. f. wiss. Zool. (1856), 7, 201.
- (143) KÖLLIKER (A.) : Ueber die Entwicklung der Samenfäden. Zeitschr. f. wiss. Zool. (1856), 7, 262.
- (144) KONIČEK (J.) : Über die kultivation des Lungenbentel und Herz gewebes bei Helix pomatia. Arch. exper. Zellforsch. (1933), 13, 709.
- (145) KOPEC (St.) : Studies on the necessity of the brain for the inception of insect metamorphosis. Biol. Bull. (1922), 42, 325.

- (146) KLOETZEL (K.) : Observações sobre o tropismo do miracídio de Schistosoma mansoni pelo molusco Australorbis glabratus. Rev. Bras. Biol. (1958), 18, 223.
- (147) KRONTOWSKY (A.) et RUMIANZEW (A.) : Zur Technik der Gewebeskulturen von Regenwürmern "in vitro". Pflügers. Arch. (1922), 195, 291.
- (148) KRONTOWSKY (A.) et SCHUSTOWA : Zur Technik der Kulturbereitubereitung der Axolotelgewebe. Zusammenfassung bei. (1914-15).
- (149) KUNTZ (R. E.) : Exposure of Planorbid snail from the Western hemisphere to miracidia of the Egyptian strain of S. mansoni. Proc. Helmint. Soc. Wash. (1952), 19, 9.
- (150) KUNTZ (R. E.) : Biology of the Schistosomes complexes. Amer. J. Trop. Med. Hyg. (1955), 4, 383.
- (151) LAGRANDE (E.) et SCHEECQMANS (G.) : Sur l'épidémiologie de la Bilharziose expérimentale a S. mansoni. C. R. Soc. Biol. (1950), 144, 1703.
- (152) LAING (J.) : Host finding by insect parasites. I - Observations on the finding of hosts by Alysia manducator, Mormoniella vitripennis and Trichogramma evanescens. J. Anim. Ecol. (1937), 6, 298.
- (153) LARUE (G. R.) : Host-parasite relations among the digenetic Trematode. J. Parasit. (1951), 37, 333.
- (154) LELAND (S. E. Jr) : The "in vitro" cultivation of the parasitic stages of Cooperia punctata, Cooperia onchophora, Ostertagia ostertagi and Ostertagia circumcincta. A preliminary report. J. Parasit. (1961), 47, 21.
- (155) LELAND (S. E. Jr.) : Studies on the "in vitro" growth of parasitic Nematodes. 1 - Complete or partial parasitic development of some gastro-intestinal Nematode of sheep and Cattle. J. Parasit. (1963), 49, 600.
- (156) LENDER (Th.) et DUVEAU-HAGEGE (J.) : Survie et différenciation des gonades larvaires de Galleria mellonella en culture organo-typique (Lépidoptère, pyralididae) C. R. Acad. Sci. (1962), 254, 2825.
- (157) LENDER (Th.) et DUVEAU-HAGEGE (J.) : La survie et la différenciation des gonades de larve de dernier âge de Galleria mellonella (Lépidoptère, pyralididae). Develop. Biol. (1963), 6, 1.
- (158) LENDER (Th.) et DUVEAU-HAGEGE (J.) : La culture organo-typique de gonades de Galleria mellonella (L.). Ann. Epi-phyt. (1963), 14 n° 3, 81.
- (159) LEVENE (P. A.) : The mucoproteins of the snails Helix aspersa and Helix pomatia. J. Biol. Chem. (1925), 65, 683.
- (160) LORTET : 1er Congrès Egyptien de Médecine C. R. I. ; Chirurgie 1905 in LEIPER. Rept. Bilharzia Miss. in Egypt. J. R. Army Med. corps. Juillet (1915).
- (161) LUTZ (A.) : Observações sobre a evolução do S. mansoni. Brasil Medico, (1916), 30 n° 49. (1917), 31 n° 10-11.

- (162) LUTZ (A.) : O. S. mansoni e a Schistosomatosa segundo observações feitas no Brasil. Mem. Inst. Osw. Cruz. (1919), 11, 121.
- (163) LWÖFF (A.) ; NITTI (F.), TREFOUEL (T.), et HAMON (V.) : Recherches sur le sulfamide et les antisulfamides. I - Action du sulfamide sur le flagellé Polytomella caeca. Ann. Inst. Pasteur, (1941), 67, 9.
- (164) MAC COY (O. R.) : The growth of hookworm larvae on pure culture of bacteria. Science (1929), 69, 74.
- (165) MAC INNIS (A. J.) : I - Response of S. mansoni miracidia to chemical attractants. II - Evidence for chemical attraction of S. mansoni miracidia. J. Parasit. (1963), 49, 38 th annual meeting of the Am. Soc. of Parasit. Chicago, 1963, n° 14, 15.
- (166) MAC QUAY (R. M.) : Studies on variability in the susceptibility of a North American snail Tropicorbis havanensis to infection with the Puerto Rican strain of S. mansoni. Trans. roy. Soc. Trop. Med. Hyg. (1953), 47, 56.
- (167) MAGALHAES NETO (B.) et MORAES (J. G.) : A composição do meio interno de Australorbis glabratus. I - Calcio, Fosforo-inorganico e cloretos. Ann. Soc. Biol. Pernambuco (1957), 15, 69.
- (168) MAGALHAES NETO (B.) et MORAES (J. G.) : A composição do meio interno de Australorbis glabratus. II - Magnésio, sodio e potássio. Ann. Soc. Biol. Pernambuco. (1959), 16, 79.
- (169) MALDONADO (J. F.) et ACOSTAMATIENZO (J.) : The development of S. mansoni in the snail intermediate host Australorbis glabratus Puerto Rico. J. Public Health. Trop. Med. (1947), 22, 4, 331.
- (170) MASAMUNE (H.) YASUOKA (T.) TAKAHASI (M.), et ASAGI (Y.) : Biochemical studies on carbohydrates. Does Mucoitin exist in the animal body as combined with sulfuric acid ? Tohoku. J. exp. Med. (1947), 49, 177.
- (171) MASAMUNE (H.) et YOSIZAWA (Z.) : Biochemical studies on carbohydrates C XXX III. Paper partition chromatograms of sugar components in glycidamine and glycoproteins. Tohoku. J. exp. Med. (1950), 53 (1 et 2), 155.
- (172) MELLON (R. R.) et Mac KINNEY (R. A.) : The cytological effect of the sulfonamide compounds on animal tissues. Med. Record. (1941), 154, 312.
- (173) MEYER (O. B.) : Ueber rhythmische spontankontraktionem von Arterien. Zeitschr. f. Biol. (1913), 61, 275.
- (174) MICHELSON (E. M.) : A technique for securing and maintaining bacteriologically sterile prosobranch snails. Tr. Am. Micr. Soc. (1959), 78, 256.
- (175) MORIN (C.) : Les données physiologiques et les problèmes histophysiologiques relatifs à l'intestin isolé. Bull. Histol. Appl. (1929), 6, 234.
- (176) MORIN (C.) : L'automatisme intestinal des Vertébrés et sa régularisation. Thèse Doct. ès-Sci. Lyon. (1935), 252 p.

- (177) MURRAY (M.) : Cultivation of planarian tissues "in vitro". J. Exp. Zool. (1927), 47, 467.
- (178) MURRAY (M.) : "In vitro" studies of planarian parenchyma. Arch. Exp. Zellf. (1931), 11, 656.
- (179) NASSE (O.) : Beitrage zur Physiologie der contractilen Substanz Pfüger's Arch. (1869), 2, 97.
- (180) NEUHAUS (W.) : Beitrage zur Frage der Wirtsfindung des Miracidiums von Fasciola hepatica. Z. Vergl. physiol. (1941), 28, 563.
- (181) NEUHAUS (W.) : Über den chemischen Sinn der Miracidium von Fasciola hepatica. Z. Parasitenk (1953), 15, 476.
- (182) NEWSOME (J.) : Maturation of Schistosome eggs "in vitro". Nature (1962), 195, 722.
- (183) NEWSOME (J.) et ROBINSON (D. L. H.) : Investigation of methods of maintaining S. mansoni "in vitro". Ann. Trop. Med. Parasit. (1954), 48, 194.
- (184) NEWTON (W. L.) : The comparative tissue reaction of two strains of Australorbis glabratus to infection with S. mansoni. J. Parasit. (1952), 38, 362.
- (185) NEWTON (W. L.) : The inheritance of susceptibility infection with S. mansoni in Australorbis glabratus. Exp. Parasit. (1953), 2 n° 3, 242.
- (186) NYSTEN (P. H.) : Recherches de physiologie et de chimie pathologiques pour faire suite à celles de Bichat sur la vie et la mort. Un vol. (1811), 427 p. Brosson, Paris édit.
- (187) OLIVIER (L.) et MAO (C. P.) : The early larval stages of S. mansoni in the snail host Australorbis glabratus J. Parasit. (1949), 35 n° 3, 267.
- (188) PAN (CHIA-TUNG) : Studies on the biological control of Schistosomes bearing snails. The general histology and topographic microanatomy of A. glabratus. J. Parasit. (1957), 43, n° 5, section 2, suppl. n° 68.
- (189) PARAENSE (W. L.) et CORREA (L. R.) : Variation in susceptibility of populations of A. glabratus to a strain of a S. mansoni. Rev. Inst. Med. Trop. (Sao Paulo), (1963) 5, 15.
- (190) PARRUM : Parrum bibliothek for Laeger (1858), 10, 46 (d'après PIKE, GUTHERIE et STEWART. J. exp. Med. (1908), 10, 371.
- (191) PASTEUR VALLERY-RADOT (L.), HALPERN (B. N.), BLAMOUTIER (P.), BIOZZI (G.) et BENACERRAF (B.) : Facteurs qui influencent la fixation locale des anticorps dans les tissus. Congr. Europ. Allergol. (1956), 3, 5 Pensiero Scient. Rome.
- (192) PELIKAN (E.) : Beitrage zur richtlichen Medizin, Toxikologie und Pharmakodynamik. Un vol. (1858), 212 p.
- (193) PREVOST (J. L.) et DUMAS (J. B.) : Troisième mémoire. De la génération dans les Mammifères, et des premiers indices du développement de l'embryon. Ann. Sc. Nat. (1824), 3, 113.

- (194) RANVIER (L.) : Leçons d'anatomie générale sur le système musculaire (1876), Notes recueillies par J. Renant. Un vol. (1880), 466 p. Delahaye, Paris édit.
- (195) REDI : Opere di Frances 1741, I p. 78 et II p. 194.
- (196) RIPPLINGER (J.) et JOLY (M.) : Rôle des constituants de l'hémolymphe sur l'activité du coeur d'Helix pomatia C. R. Soc. Biol. (1961), 155, 825.
- (197) ROBINSON (D. L. H.) : Egg-laying by Schistosoma mansoni "in vitro" Ann. Trop. Med. parasit. (1960), 54, 112.
- (198) RODANICHE (E. C.) et KIRSNER (J. B.) : The effects of sulfo-namides compounds on the growth of E. histolytica in culture. J. Parasit. (1942), 28, 441.
- (199) ROUBAUD (E.) : Recherches sur la transmission de la Bilharziose en France. Bull. Soc. Path. exot. (1918), 11, 854.
- (200) RUMJANZEN (A.) : Observation on the regeneration of the anterior end in the Lumbricoidae. Rev. Zool. Russe (1917), 1.
- (201) SCHULTZ (E.) : Nouvelles expériences sur la survie des fragments tissulaires. C. R. Soc. Biol. (1916), 79, 207.
- (202) SCHULTZ (P.) : Ueber der Einfluss der Temperatur auf die Leistungsfähigkeit der längsgestreiften Muskeln der Wirbeltiere. Arch. f. Anat. u. Physiol. (1897), 3, 1.
- (203) SCHLUTZ (P.) : Zur Physiologie der laugestreiften (glatten) Muskeln Spontane Bewegungen, Tonus, Peristaltik. Arch. f. Anat. u. Physiol. (1897), 3, 322.
- (204) SCHWETZ (J.), BAUMANN (M.) et FORT (M.) : Planorbis dufourii (P. medidjensis du Portugal) hôte intermédiaire expérimental de S. mansoni. Bull. Soc. Path. exot. (1955), 48, 344.
- (205) SCHWETZ (J.), BAUMANN (M.) et FORT (M.) : Nouveaux essais de transmission de S. mansoni par P. dufourii et P. corneus Bull. Soc. Path. exot. (1955), 48, 658.
- (206) SENECA (H.) et BERGENDAHL (E.) : Toxicity of antibiotics to snails. Antib. and Chimio. (1955), 5, 735.
- (207) SENFT (A. W.) et SENFT (D. G.) : A chemically defined medium for maintenance of Schistosoma mansoni. J. Parasit. (1962) 48, 551.
- (208) SENFT (A. W.) et WELLER (T. H.) : Growth and regeneration of Schistosoma mansoni "in vitro". Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) (1956), 93, 16.
- (209) SENDEL (C.) : Cultures "in vitro" de blastèmes de régénération de Planaires. J. Embryol. exp. morph. (1960), 8, 468.
- (210) SENDEL (C.) : Culture in vitro de blastèmes de régénération de la Planaire Dugesia lugubris. Epiphyties (1963), 14, III, 173.
- (211) SENDEL (P.) : Survie en culture "in vitro" de divers organes d'Invertébrés marins adultes. C. R. Acad. Sci. (1961), 252, 3666.
- (212) SENDEL (P.) : Explantation "in vitro" de quelques organes d'Invertébrés marins adultes. Bull. Soc. Zool. Fr. (1961) 86, 301.

- (213) SENDEL (P.) : Utilisation de la culture organo-typique pour l'étude de la morphogénèse et de l'endocrinologie chez les Invertébrés. Bull. Soc. Zool. Fr. (1964), n° 1, 10.
- (214) SENDEL (P.) et KIENY (M.) : Action de divers liquides nutritifs et du complexe "glande neurale, ganglion nerveux, organe vibratile" sur les gonades de Molgula manhattensis (Tunicier Ascidiacé) cultivées in vitro. C. R. Acad. Sci. (1962), 254, 1682.
- (215) SENDEL (P.) et KIENY (M.) : Rôle du complexe formé par la glande neurale, le ganglion nerveux et l'organe vibratile sur la différenciation sexuelle des gonades de Molgula manhattensis (Tunicier Ascidiacé). Bull. Soc. Zool. Fr. (1962), 87, n° 5-6, 615.
- (216) SILVERMAN (P. M.) : "In vitro" cultivation of the histotropic stages of Haemonchus contortus and Ostertagia. Nature (1959), 183, 197.
- (217) SMYTH (J. D.) : Studies on Tapeworm physiology II. Cultivation and development of Ligula intestinalis in vitro. Parasitology. (1947), 38, 173.
- (218) SMYTH (J. D.) : Studies on tapeworm physiology. Further observations on the maturation of Schistocephalus solidus (Diphylobothriidae) under sterile conditions in vitro. J. Parasit. (1950), 36, 371.
- (219) SPALLANZANI (L.) : Opusculs de physique animale et végétale 1776. Traduction de l'italien 1787 par J. Senebier 2 vol. Paris - Observations et expériences sur quelques animaux surprenants, que l'observateur peut à son gré faire passer de la mort à la vie. vol. 2 p. 203.
- (220) STIREWALT (M. A.) : The frequency of bisexual infection of Schistosoma mansoni in snails of the species Australorbis glabratus. J. Parasit. (1951), 37, 42.
- (221) STOLL (N.) : Axenic cultivation of the parasitic Nematode Neoplectana glaseri in a fluid medium containing raw liver extract. J. Parasit. (1953), 39 n° 4, 422.
- (222) STRANGEWAYS (T. S. P.) et FELL (H. B.) : Experimental studies on the differentiation of embryonic tissues growing in vivo and in vitro. I - The development of the undifferentiated limb bud. Proc. Roy. Soc. (1927), 99, 340.
II - The development of the isolated early eye of the fowl when cultivated "in vitro". Proc. Roy. Soc. (1927), 100, 273.
- (223) STREIFF (M.) et PEYRE (A.) : Survie en culture "in vitro" d'organes de Calyptraea sinensis (Mollusque prosobranch) C. R. Acad. Sci. (1963), 256, 292.
- (224) STUNKARD (H. W.) : Possible snails hosts of human schistosomes in the United States. J. Parasit. (1946), 32, 539.
- (225) SUDDS (Jr. R. H.) : Observations of Sh. miracidial behaviour in the presence of normal and abnormal hosts and subsequent tissue studies of the hosts. J. Elisha. Mitchell. Soc. (1960), 76, 121.

- (226) TARGETT (G. A. T.) : The amino-acid composition of blood from snail hosts of schistosomiasis. Ann. Trop. Med. Parasit. (1962), 56, 61.
- (227) TARGETT (G. A. T.) : A study of the amino-acids present in Lymnea stagnalis, Planorbium corneum and Australorbis glabratus, before and after infection with Schistosoma mansoni. Ann. trop. Med. Parasit. (1962), 56, 210.
- (228) TARGETT (G. A. T.) : Absorption spectra of blood proteins from intermediate and non intermediate hosts of Schistosomes. J. Helminth. (1962), 36, 201.
- (229) THOMAS (J. A.) : Recherches cytologiques et expérimentales sur les vésicules énigmatiques et les urnes du Siponcle. Arch. Zoo. exp. et gén. (1932), 73, 22.
- (230) THOMAS (J. A.) : La culture des vésicules énigmatiques et des urnes du Siponcle. C. R. Soc. Biol. (1932), 110, 451.
- (231) THOMAS (J. A.) : La survie d'organites des Stellérises "in vitro". C. R. Acad. Sci. (1941a), 213, 85.
- (232) THOMAS (J. A.) : La différenciation des organites d'Echinodermes en survie "in vitro". C. R. Acad. Sci. (1941b), 213, 252.
- (233) THOMAS (J. A.) : Influence du p. aminophénylsulfamide sur le développement de l'Oeuf d'Oursin. Effet sur la multiplication des blastomères et évolution des larves. C. R. Acad. Sci. (1941c), 213, 890.
- (234) THOMAS (J. A.) : Action du p. aminophénylsulfamide sur la chromatine de l'oeuf d'Oursin en segmentation. C. R. Acad. Sci. (1941d), 214, 90.
- (235) THOMAS (J. A.) : Action comparée de quelques sulfamides azotiques et sulfonés sur le blocage de la segmentation de l'oeuf d'Oursin. C. R. Soc. Biol. (1942), 136, 789.
- (236) THOMAS (J. A.) : Evolution nucléaire de l'oeuf d'Oursin en segmentation après blocage de la mitose par la 4-oxy 4' aminophénylsulfone. C. R. Soc. Biol. (1943a), 137, 12.
- (237) THOMAS (J. A.) : Essais sur le mécanisme de l'action mitoclasique des sulfamides et des sulfones chez l'oeuf d'Oursin en segmentation. Evolution de la sensibilité des larves au cours du développement. C. R. Soc. Biol. (1943b), 137, 38.
- (238) THOMAS (J. A.) : Sur l'exogastrulation et l'inhibition du développement de la ciliature larvaire chez l'Oursin sous l'influence d'un azotique sulfone. C. R. Soc. Biol. (1943c), 137, 72.
- (239) THOMAS (J. A.) : La survie d'organites non stériles en milieu antiseptique et nutritif comme procédé d'analyse morphogénétique. C. R. Acad. Sci. (1947), 225, 148.
- (240) THOMAS (J. A.) : Survie et conservation biologique. Exposés annuels de Biol. Cell. 1963. Masson, Edit. Paris.
- (241) THOMAS (J. A.) et BORDERIOUX (I.) : La survie expérimentale d'organites d'Urodèles en milieu synthétique, antiseptique et nutritif. C. R. Acad. Sci. (1947), 225, 963.

- (242) THOMAS (J. A.) et BORDERIOUX (I.) : Recherches sur la survie expérimentale d'organites chez les Urodèles en milieu synthétique, antiseptique et nutritif. Arch. Anat. Micros. (1948), 37, 263.
- (243) THOMAS (J. A.) et THIERY (J. P.) : Emploi du liquide amniotique déprotéiné et purifié. Culture et conservation prolongée des tissus ; cultures microbiennes. Bull. Ste. Chim. Biol. (1953), 35, 841.
- (244) TRAN VAN KY (P.), ROSE (F.) et LAUDE (F.) : L'étude immunoelectrophorétique de la structure antigénique des Molulusques est-elle susceptible de résoudre certaines difficultés de leur taxonomie ? C. R. Acad. Sci. (1962), 255, 366.
- (245) TUZET (O.) : Survie des trompes de Bonellie séparées du corps. Bull. Soc. Zoo. (1932), 57, 401.
- (246) VALETTE (G.), COHEN (Y.) et HINDOBRO (H.) : Action du calcium à l'état complexé par l'acide éthylène-diamine-tétra-acétique sur la sensibilité des organes isolés à divers agents pharmacodynamiques. J. Physiologie. (1957), 49, 409.
- (247) VAGO (C.) : Cultures de tissus prolongées à observation directe. Microscopie. (1958), 13, 520.
- (248) VAGO (C.) et CHASTANG (S.) : Obtention de lignées cellulaires en culture de tissus d'Invertébrés. Experimentia (1958), 14, 110.
- (249) VEILLET (A.) : Description et mécanisme de la métamorphose de la larve Actinotroque de Phoronis sabatieri Roule. Bull. Inst. Oceanogr. (1941), 810, 1.
- (250) VIRCHOW'S : Archiv (1899) 157, 172 (in Morpurgo).
- (251) VOGEL (H.) : Infektions versuche an verschiedenen Bilharzia. Zwischenwizten mit einem einseinen Mirazidium von Bilharzia mansoni und B. japonica. Zentr. Bakt. Abt. (1941), 148, 29.
- (252) VULPIAN (A.) : Recherches sur la durée de la contractibilité du coeur après la mort. Mém. Soc. Biol. (1858), 5 (2e série), 3.
- (253) VULPIAN (A.) : Notes sur les phénomènes qui se passent dans la queue des très jeunes embryons de Grenouilles, lorsqu'on l'a détachée du corps. C. R. Soc. Biol. (1858), 5 (2e série), 81.
- (254) VULPIAN (A.) : Notes sur les phénomènes de développement qui se manifestent dans la queue de très jeunes embryons de Grenouilles après qu'on l'ai séparée du corps par une section transversale. C. R. Acad. Sci. (1859), 48, 807.
- (255) WEINBACH (E. C.) et NOLAN (M. O.) : The effect of pentachlorophenol on the metabolism of the snail Australorbis glabratus. Exp. Parasit. (1956), 5, 276.
- (256) WEINSTEIN (P.) : The cultivation of free-living stages of hookworms in the absence of living bacteria. Amer. J. Hyg. (1953), 58 n° 3, 352.

- (257) WEINSTEIN (P. P.) et JONES (M. F.) : The in vitro cultivation of Nippostrongylus muris to the adulte stage. J. Parasit. (1956), 42, 215.
- (258) WILDE (C. E.) : Organogenesis in vitro of Amblystoma embryonic tissue. Anat. Rec. (1948), 101, 661.
- (259) WILLIAMS (C. M.) : Physiology of insect diapause. Interaction between the pupal brain and prothoracic glands in the metamorphosis of the giant silkworm, Platysamia Cecropia. Biol. Bull. (1947), 93, 89.
- (260) WOLFF (Em.) : Cultures organo-typiques de tissus de jeunes Limules. Bull. Soc. Zool. (1962), 87, 120.
- (261) WOLFF (Em.) : Sur l'explantation "in vitro" de fragments d'organes de Limules (Xiphosura polyphemus). Ann. Epiphyt. (1963), 14, n° hors série IV, 113.
- (262) WOLFF (Et.) : Principe d'une méthode de culture d'organes embryonnaires en milieux synthétiques. C. R. Soc. Biol. (1953), 147, 857.
- (263) WOLFF (Et.) : Les facteurs de la croissance et de la différenciation des organes embryonnaires en culture "in vitro". In Thomas, Exposés actuels de Biologie cellulaire. 1956. Les facteurs de la croissance cellulaire, activation et inhibition. Masson, Paris, édit. p. 157.
- (264) WOLFF (Et.) : Sur une nouvelle modalité de la culture organo-typique. C. R. Acad. Sci. (1960), 250, 3881.
- (265) WOLFF (Et.) et HAFFEN (K.) : Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires in vitro. Texas, Report, Biol. Med. (1952), 10, 463.
- (266) WOLFF (L. K.) et JULIUS (H. W.) : Action du sulfamide "in vitro" et "in vivo". Ann. Inst. Pasteur. (1939), 62, 616.
- (267) WOODS (D. D.) et FILDES (P.) : The antisulphanilamide activity "in vitro" of p. aminobenzoic acid and related compounds. Chem. and Industry, (1940), 59, 133.
- (268) WOODWORTH (R. S.) : Studies on the contraction of smooth muscle Amer. J. Physiol. (1899), 3, 26.
- (269) WRIGHT (C. A.) : Some factors affecting the susceptibility of snails to infection with miracidia of Schistosoma. Bull. Soc. Path. exot. (1956), 49, 1211.
- (270) WRIGHT (C. A.) : The application of paper chromatography to a taxonomic study in the molluscan genus. Lymnea J. Linn. Soc. (1959), 44, 222.
- (271) WRIGHT (C. A.) : Host location by Trematode miracidia. Ann. Trop. Med. Parasit. (1959), 53, 288.
- (272) WRIGHT (C. A.) et ROSS (G. C.) : Electrophoresis of snail blood. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. (1959), 53, 308. et Ann. Trop. Med. Parasit. (1963), 57, 47.
- (273) ZWEIBAUM (J.) : Analyse histophysiologique de l'épithélium vibratile en état de survie "in vitro". C. R. Soc. Biol. (1925), 93, 785.

ICONOGRAPHIE

PLANCHE I



Fig. 5 - Tentacule attaché au Planorbe. - Situation de l'oeil. 31 X.

Fig. 6 - Détails de la fig. 5. 135 X.

Fig. 7 - Tentacule sectionné. On remarque l'épithélium externe, les fibres musculaires et l'artère centrale. 72 X.

Fig. 8 - Détails d'un tentacule sectionné : épithélium cilié-fibres musculaires-artère centrale. 500 X.

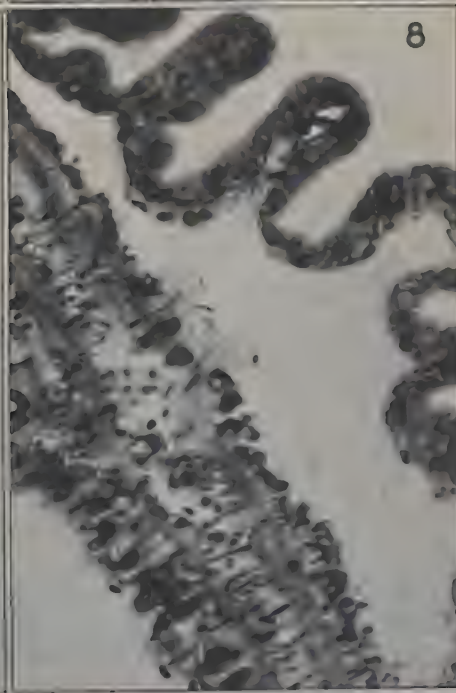


PLANCHE II



LA CICATRISATION

Fig. 9 - Tentacule en survie depuis deux jours. Cicatrisation type I.

On notera la présence des sinus sanguins. 72 X.

Fig. 10 - Tentacule fraîchement sectionné. Cicatrisation type II. 72 X.

Fig. 11 - Détail du bourgeon de cicatrisation. 135 X.

Fig. 12 - Cicatrisation type II terminée. 135 X.

oOo

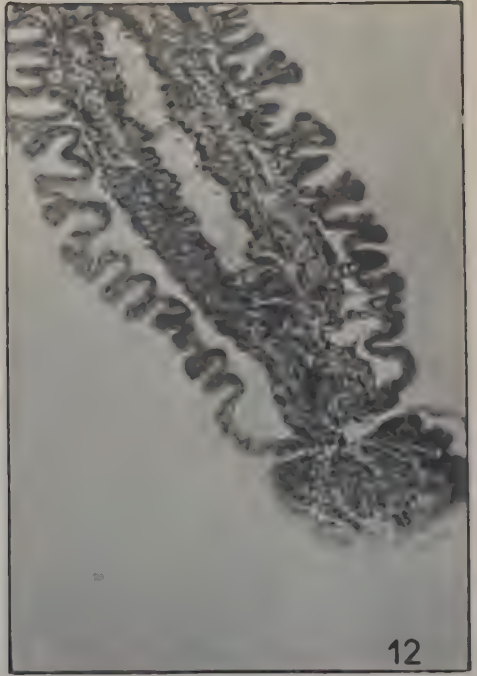
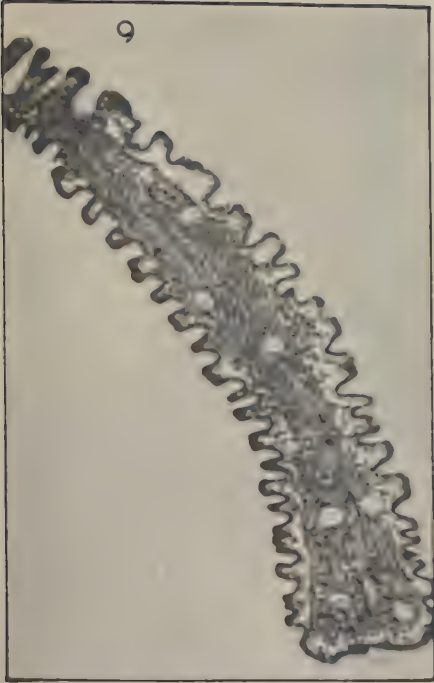


PLANCHE III



Fig. 13 - Tentacule en survie depuis dix jours. 72 X.

Fig. 14 - Tentacule en survie depuis 15 jours début de la différenciation. 72 X.

Fig. 15 - Tentacule en survie depuis 3 semaines. Organisation en ovoïde. 135 X.

Fig. 16 - Tentacule en survie depuis 4 semaines. Organisation en sphère. 135 X.

oOo

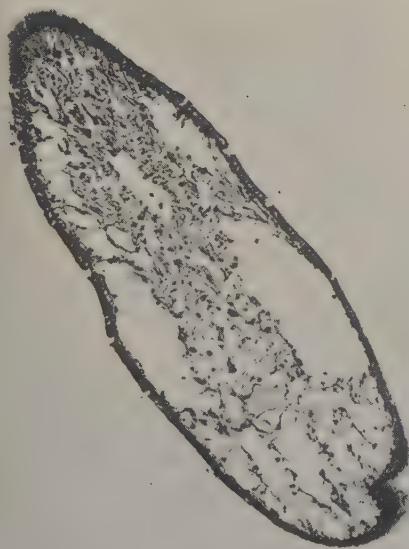
13



14



15



16

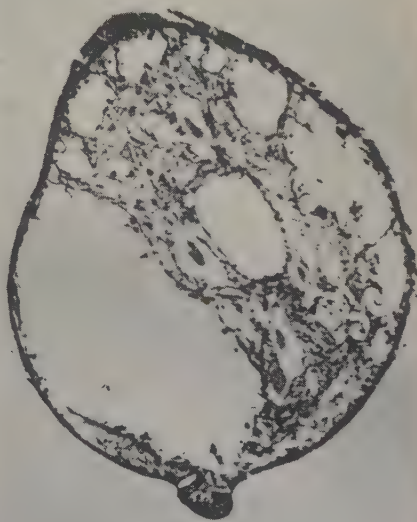


PLANCHE IV



LA DEDIFFERENCIATION

Fig. 17 - Détails d'un tentacule au 2e jour de survie.
Toutes les structures sont intactes. 260 X.

Fig. 18 - Tentacule en survie depuis dix jours. Les fibres musculaires perdent leur orientation. Début de la dédifférenciation tissulaire. 260 X.

Fig. 19 - Dédifférenciation accentuée dans un tentacule en survie depuis 15 jours. Fibres musculaires réduites à des tronçons. Fibres nerveuses en dégénérescence. 260 X.

Fig. 20 - Dédifférenciation maxima dans un tentacule en survie depuis 4 semaines. 260 X.



PLANCHE V

LE SYSTEME NERVEUX

IMPREGNATIONS METALLIQUES.

Fig. 21 - Tentacule entier en survie depuis 2 jours. 72 X.

Fig. 22 - Détails du tentacule de la fig. 21. Les fibres nerveuses sont intactes. 260 X.

Fig. 23 - Nerf central d'un tentacule en survie depuis 3 jours. 1000 X.

Fig. 24 - Eléments nerveux dans un tentacule en survie depuis 10 jours. Massif de cellules ganglionnaires. 260 X.

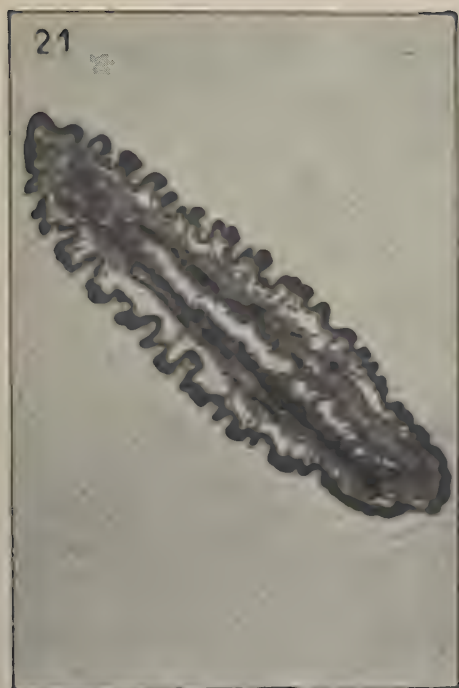


PLANCHE VI

DÉGÉNÉRESCENCE DU SYSTÈME NERVEUX

IMPREGNATIONS MÉTALLIQUES

Fig. 25 - Début de la dégénérescence des éléments nerveux dans un explant âgé de 10 jours. 500 X.

Fig. 26 - Dégénérescence nerveuse dans un explant de 12 jours. 500 X.

Fig. 27 - Explant au 18^e jour de survie. Envahissement par les cellules de la neuroglie, du territoire nerveux. 260 X.

Fig. 28 - Cellules de la neuroglie en dégénérescence dans un explant âgé de 4 semaines. 1.000 X.

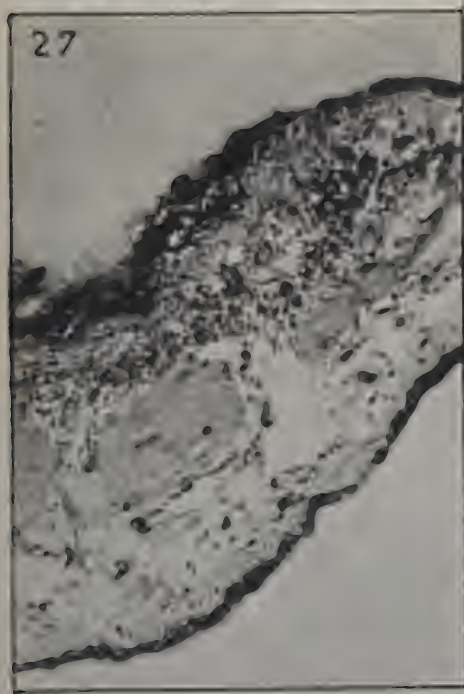


PLANCHE VII



EVOLUTION COMPARATIVE DES EXPLANTS POURVUS, OU DEPOURVUS D'ELEMENTS NERVEUX IMPORTANTS.

Fig. 29 - Tentacule muni de son oeil au 12e jour de survie.
La forme et les structures sont conservées. 135 X.

Fig. 30 - Tentacule dépourvu d'oeil au 12e jour de survie.
La dédifférenciation structurale est déjà amorcée.
Le début d'organisation en sphère apparaît. 135 X.

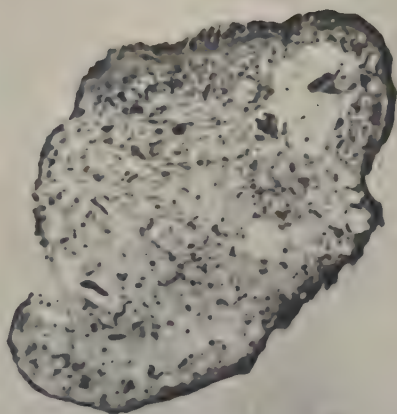
Fig. 31 - Explant de 16 jours dans lequel les éléments nerveux
ont dégénérés. La dédifférenciation structurale est
prononcée. 260 X.

Fig. 32 - Explant en survie depuis 3 semaines. La dégénéres-
cence des éléments nerveux est complète. L'organi-
sation en sphère est parfaite. Mais l'épithélium cilié
est intact. 260 X.

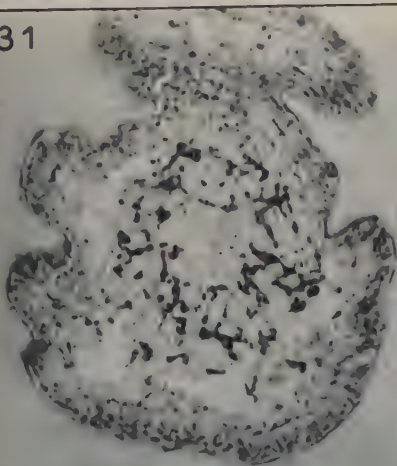
29



30



31



32

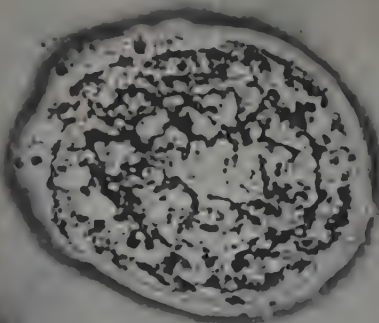


PLANCHE VIII



DEGENERESCENCE DE L'OEIL

Fig. 33 - Oeil dans un explant en survie depuis 4 jours. La structure est inchangée. 260 X.

Fig. 34 - Oeil au 8^e jour de la survie. La dégénérescence débute mais toutes les structures sont encore bien visibles. 260 X.

Fig. 35 - Oeil dans un explant âgé de 12 jours. La dégénérescence est profonde, accompagnée de dédifférenciation tissulaire. 260 X.

Fig. 36 - Oeil dans un explant en survie depuis 20 jours. Aucune des structures primitives n'est plus visible. 260 X.

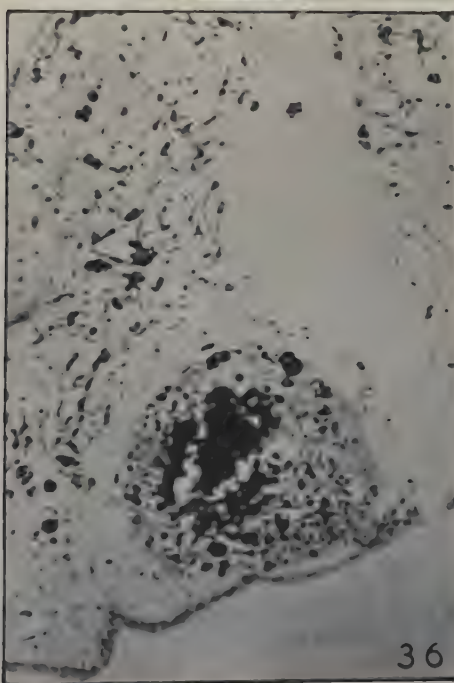
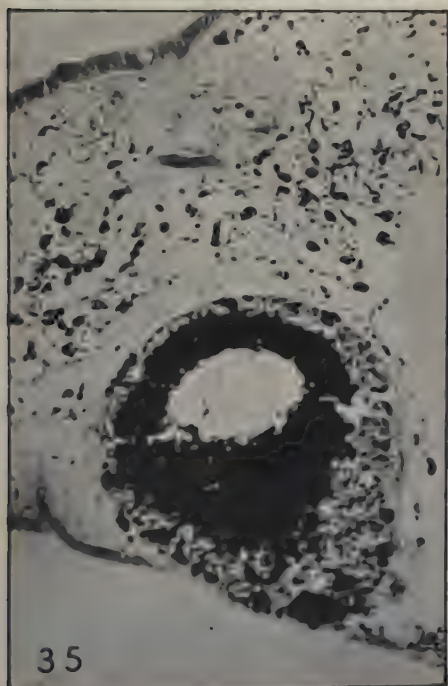
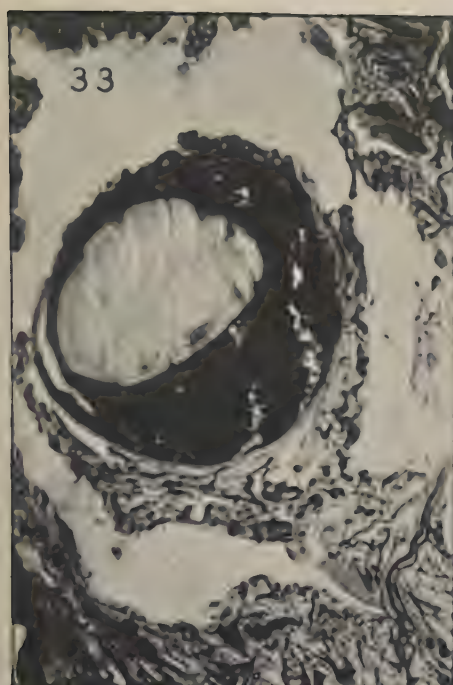


PLANCHE IX

EVOLUTION DES SPOROCYSTES MERES DANS LE MOLLUSQUE

Fig. 37 - Miracidium venant de pénétrer dans le Mollusque 1.000 X.

Fig. 38 - Début de la multiplication cellulaire d'un miracidium, 500 X

Fig. 39 - Sporocystes mères en évolution, 610 X

Fig. 40 - Sporocystes mères en fin d'évolution, 1 000 X

oOo

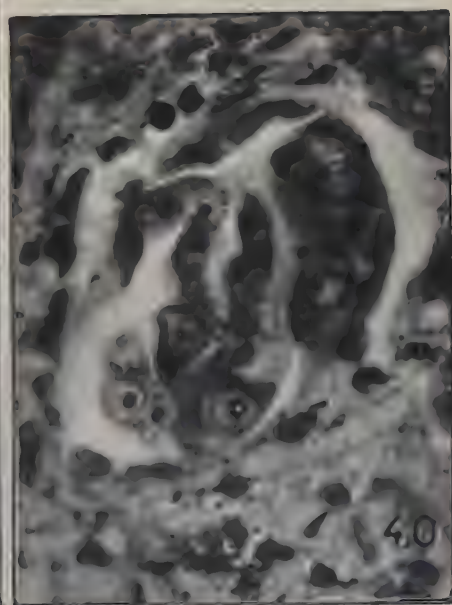
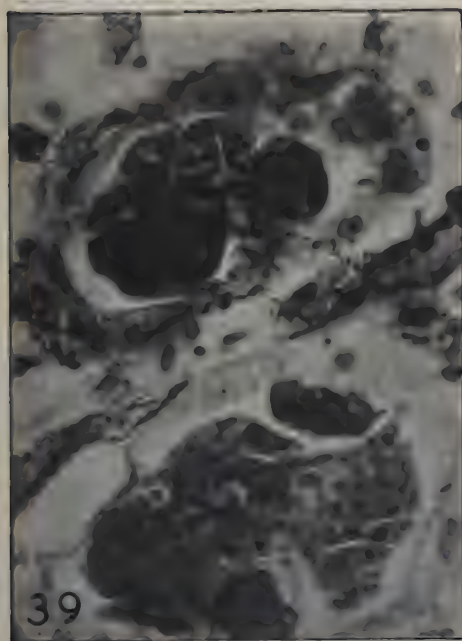
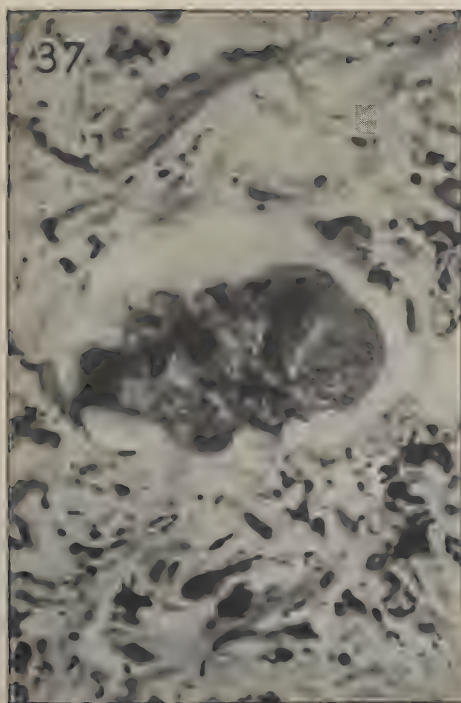


PLANCHE X



EVOLUTION DES SPOROCYSTES MERES DANS LES EXPLANTS

Fig. 41 et 42 - Deux tentacules en survie infestés depuis 1 semaine.
Les sporocystes mères sont bien visibles, 135 X

Fig. 43 et 44 - Détails des sporocystes mères des fig. 41 et 42.
610 X.

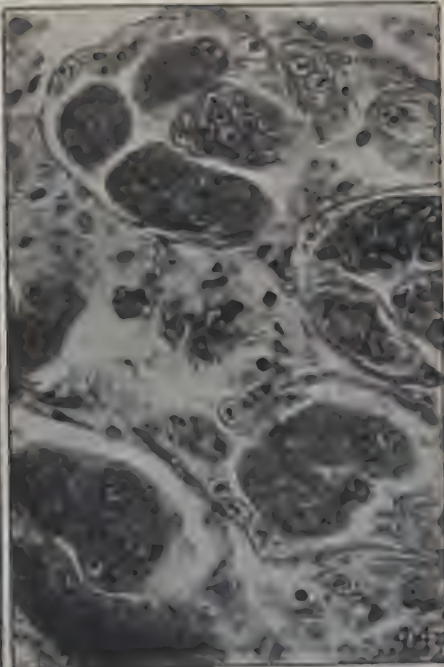
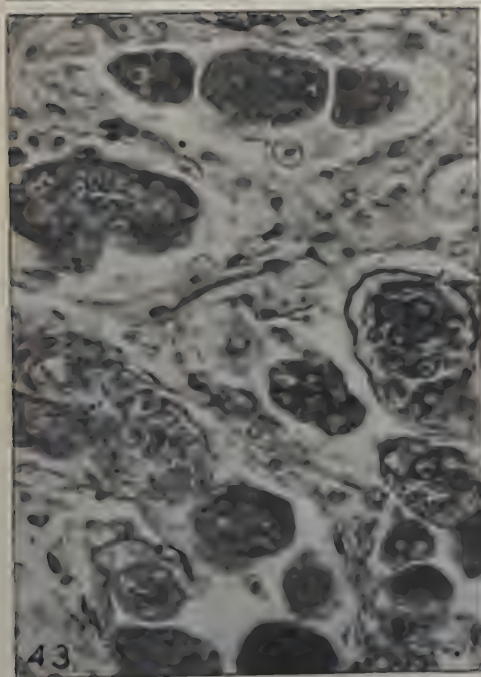


PLANCHE XI

EVOLUTION DES SPOROCYSTES FILLES DANS LE MOLLUSQUE

Fig. 45 - Sporocystes filles en évolution. 610 X.

Fig. 46 - Sporocyste fille prêt à migrer. 610 X

Fig. 47 - Un sporocyste fille en migration vers l'hépatopancréas.
610 X.

Fig. 48 - Coupe de l'hépatopancréas d'un Planorbe infesté
5 semaines auparavant. Les sporocystes filles sont
fixés, et les ébauches des Cercaires visibles. 135 X.

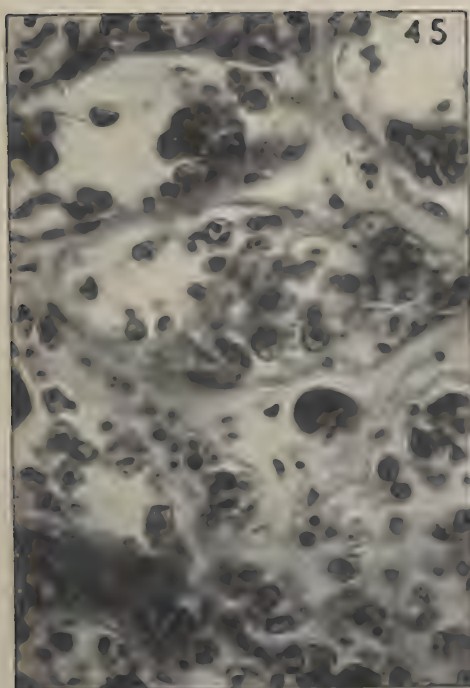


PLANCHE XII



EVOLUTION DES SPOROCYSTES FILLES DANS DES EXPLANTS

Fig. 49 - Sporocystes en évolution dans un explant où la différenciation tissulaire est déjà bien avancée. 15^e jour après l'infestation. 72 X.

Fig. 50 - Détails des sporocystes de la fig. 49. 260 X.

Fig. 51 et 52 - Stades terminaux de l'évolution des sporocystes dans les explants. 610 X.

oOo

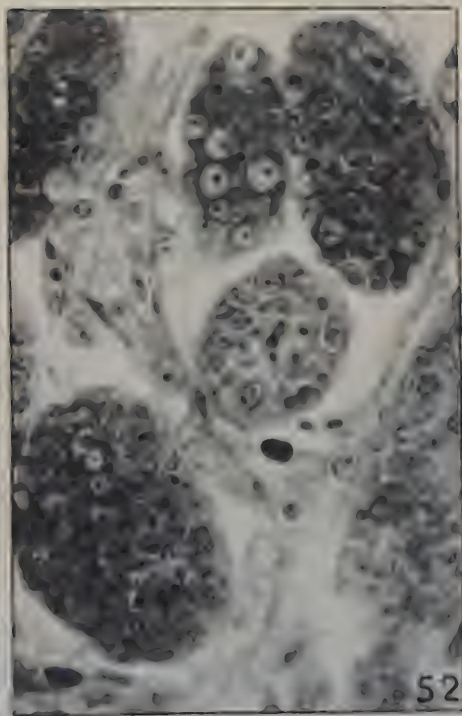
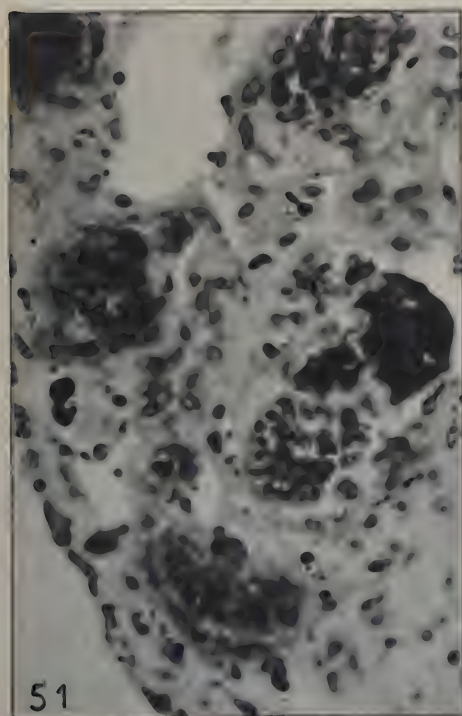
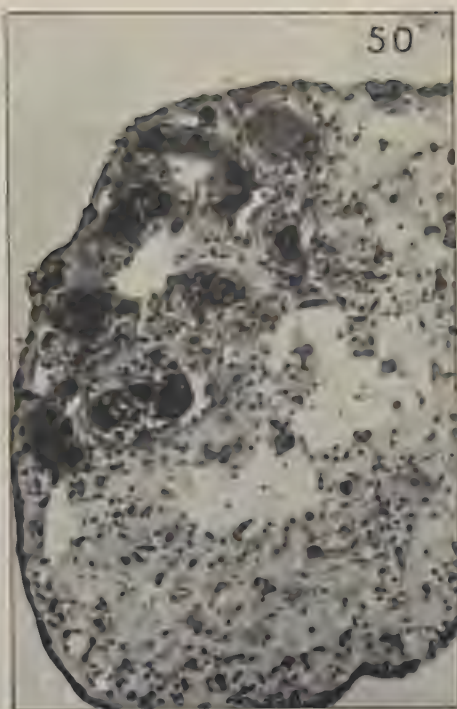


PLANCHE XIII



EVOLUTION ABORTIVE DU PARASITE DANS LES TISSUS D'UN MOLLUSQUE

Fig. 53 - Sporocyste mère anormal, 2 jours après l'infestation.
On notera la réaction cellulaire de l'hôte. 135 X.

Fig. 54 - Ebauche de multiplication germinative d'un sporocyste
mère dans les tissus d'un Planorbe réfractaire. Les
tissus de l'hôte réagissent par la formation d'une coque
fibreuse. 610 X.

Fig. 55 - Dégénérescence d'un sporocyste mère anormal 610 X

Fig. 56 - Détails du sporocyste de la fig. 55. 1 000 X.

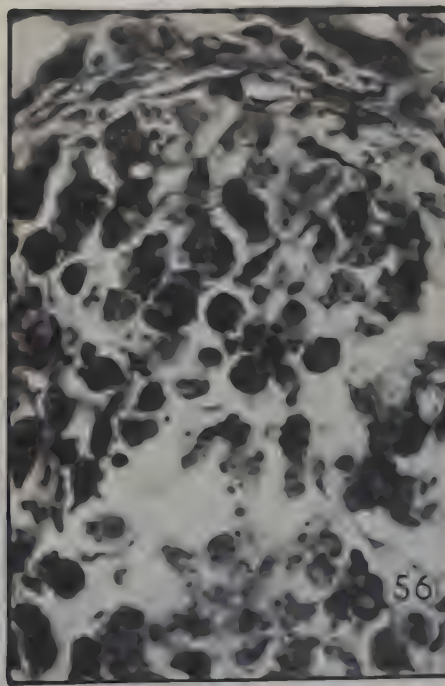
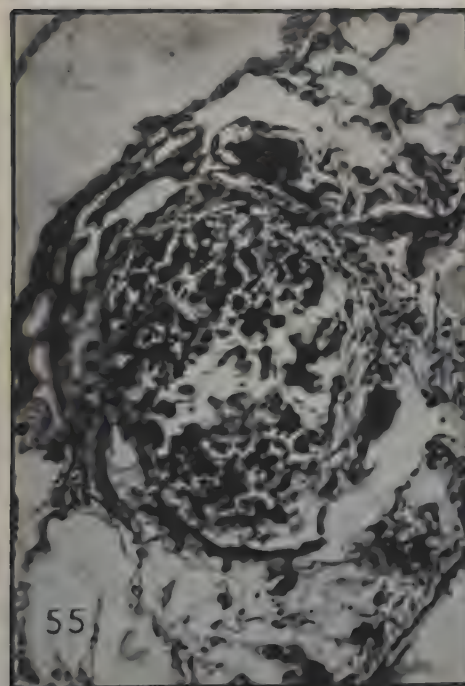
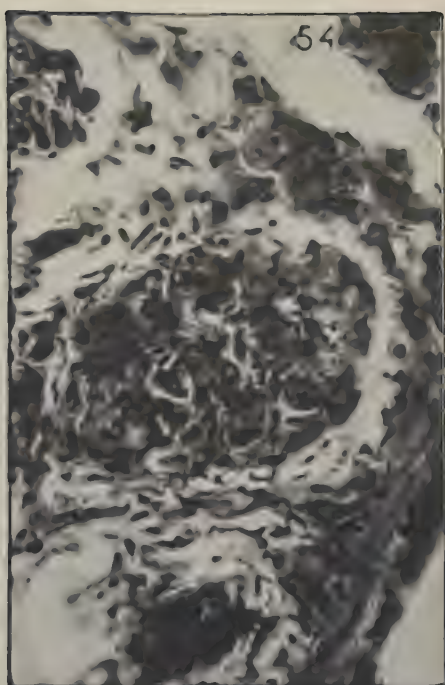
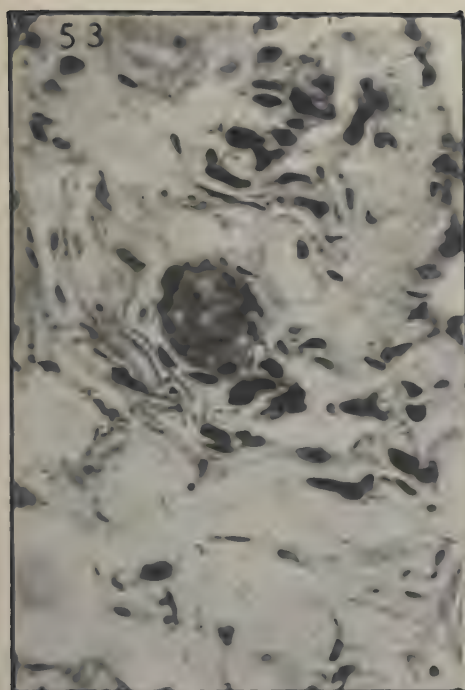


PLANCHE XIV



EVOLUTION ABORTIVE DU PARASITE DANS UN EXPLANT

Fig. 57 - Sporocyste mère anormal dans un tentacule, 24 heures après infestation. 72 X.

Fig. 58 - Détails de la fig. 57. On remarquera l'absence de réactions tissulaires autour du parasite. 260 X.

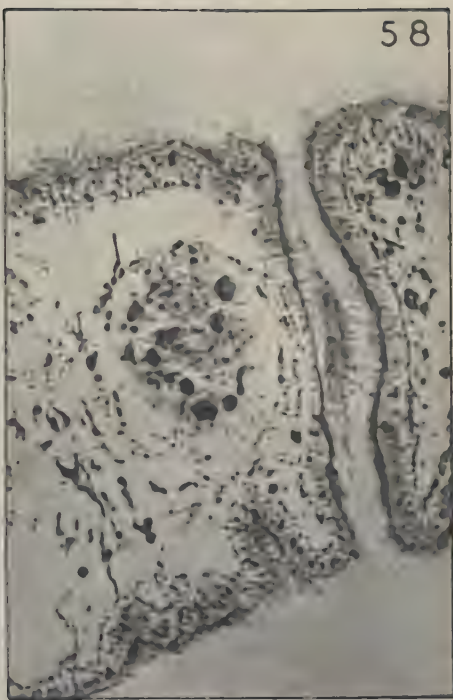
Fig. 59 - Sporocyste en dégénérescence dans un explant, 3 jours après infestation. 135 X

Fig. 60 - Détails de la fig. 59. Noter l'absence de coque fibreuse. 610 X.

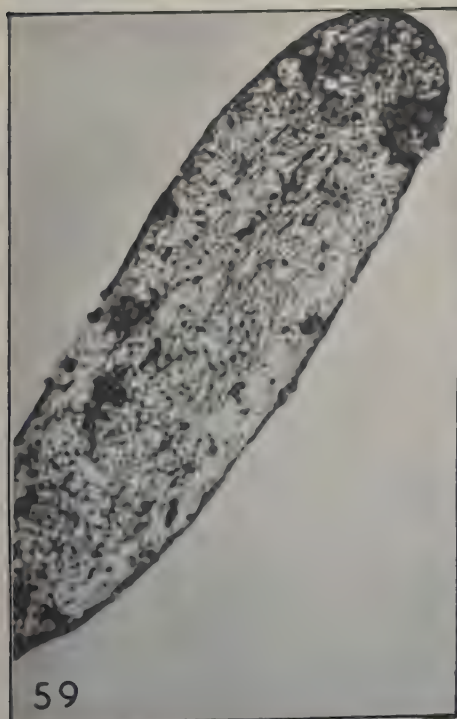
57



58



59



60

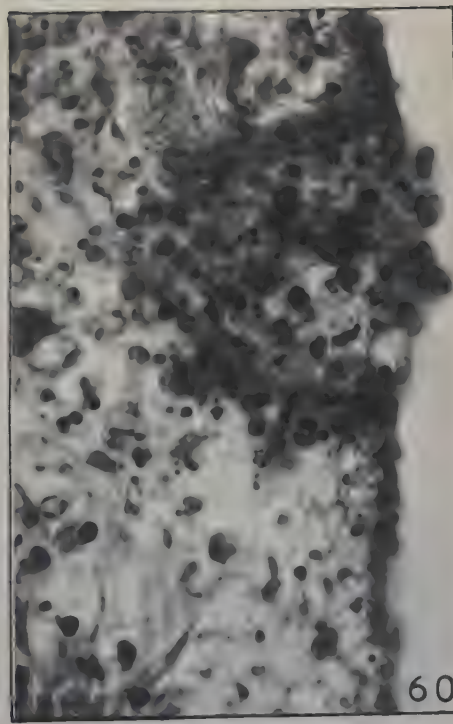


PLANCHE XV



Fig. 61 - Secrétion P.A.S. ++ de l'épithélium externe d'un tentacule en survie depuis 2 jours.

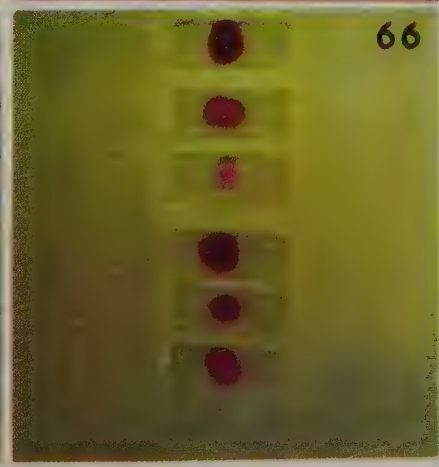
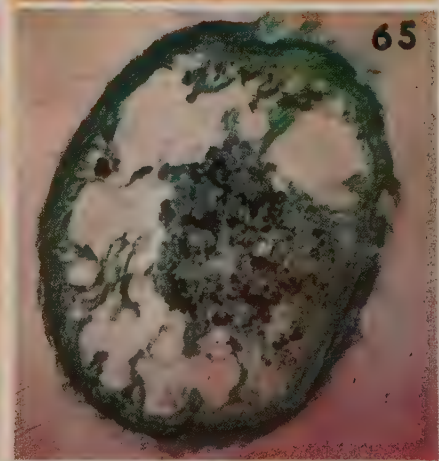
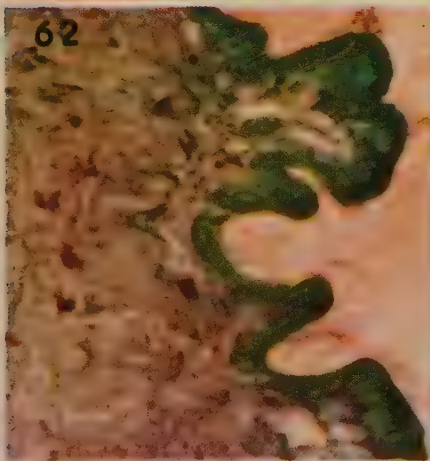
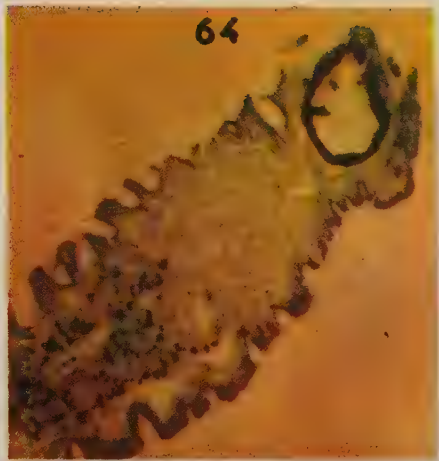
Fig. 62 - Disparition de la sécrétion (P.A.S. = 0) après traitement de l'explant de deux jours, par la thiomucase.

Fig. 63 - Réapparition de la sécrétion P.A.S. + dans un tentacule traité par la thiomucase et remis en survie 24 heures.

Fig. 64 - Tentacule pourvu de son oeil au septième jour de survie. Secrétions épithéliales P.A.S. ++.

Fig. 65 - Tentacule au vingtième jour de survie (forme ronde). Sécrétion complètement négative. P.A.S. = 0

Fig. 66 - Plaques de gélose ayant reçues des sécrétions de Mollusques ou d'explants. - P.A.S. intensité variable.



DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

"L'immunité dans les affections à Plasmodium"

Vu et approuvé :

Paris, le 23 avril 1965

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Marc ZAMANSKY

Vu

et Permis d'imprimer :

**Le Recteur de l'Académie
de Paris,**

Jean ROCHE

